



EL PAPEL DEL SISTEMA BDNF- TrkB EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA INDEPENDIENTE DE RECEPTORES TIPO NMDA INDUCIDA POR XANTINAS

TESIS DOCTORAL

JESÚS JAVIER BALLESTEROS CARRASCO

DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS

Departamento de Anatomía, Histología, y Neurociencia. Universidad Autónoma de Madrid.



Eduardo D. Martín Montiel, Investigador Principal del Grupo de Neurofisiología y Plasticidad Sináptica del Instituto de Investigación en Discapacidades Neurológicas de la Universidad de Castilla-La Mancha,

CERTIFICA:

Que **Jesús Javier Ballesteros Carrasco**, Licenciado en Biología, ha realizado bajo mi dirección los trabajos de investigación recogidos en la presente Tesis Doctoral que lleva por título “**EL PAPEL DEL SISTEMA BDNF-TrkB EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA INDEPENDIENTE DE RECEPTORES TIPO NMDA INDUCIDA POR XANTINAS**”.

Esta Tesis Doctoral reúne la calidad y el rigor científico necesarios para ser defendida en la Universidad Autónoma de Madrid como requisito para que **Jesús Javier Ballesteros Carrasco** aspire al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, expido el presente certificado en Albacete a 8 de Junio de 2015.

Dr. Eduardo D. Martín Montiel

ÍNDICE

<i>Agradecimientos</i>	8
<i>Abreviaturas</i>	12
<i>Introducción</i>	16
El hipocampo	18
La memoria y el aprendizaje en el hipocampo	21
Plasticidad sináptica	23
POTENCIACIÓN SINÁPTICA A LARGO PLAZO	23
LTP NMDA-DEPENDIENTE	24
LTP NMDA-INDEPENDIENTE	25
LA ACTIVIDAD RÍTMICA EN EL HIPOCAMPO	26
La adenosina en el hipocampo	27
LA CAFEÍNA COMO COMPUESTO PSICOTRÓPICO	28
El sistema BDNF-TrkB Y el aprendizaje	32
<i>Hipótesis y objetivos</i>	38
<i>Materiales y métodos</i>	42
Animales	42
Fármacos y reactivos	42
Electrofisiología <i>in vitro</i>	42
OBTENCIÓN DE RODAJAS DE CEREBRO	42
EQUIPO DE REGISTRO EXTRACELULAR IN VITRO	43
REGISTRO DE LA ACTIVIDAD DE CAMPO	45
PROTOCOLOS DE INDUCCIÓN DE POTENCIACIÓN SINÁPTICA	47
ANÁLISIS DE LOS REGISTROS DE ACTIVIDAD DE CAMPO IN VITRO	48
FACILITACIÓN POR PARES DE PULSOS	49
Electrofisiología <i>in vivo</i> en animal anestesiado	50
EQUIPAMIENTO	50
CIRUGÍA	51
REGISTRO DE LA ACTIVIDAD RÍTMICA DEL HIPOCAMPO	53
ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD RÍTMICA DEL HIPOCAMPO	54

Electrofisiología <i>in vivo</i> en animal despierto.....	56
CIRUGÍA.....	56
REGISTROS DE ACTIVIDAD RÍTMICA	56
ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD RÍTMICA	57
Cuantificación de BDNF	58
OBTENCIÓN DE RODAJAS DE HIPOCAMPO.....	58
CONDICIONES EXPERIMENTALES DE INCUBACIÓN PARA ELISA	58
CONDICIONES EXPERIMENTALES DE INCUBACIÓN PARA ELISA <i>IN SITU</i>	60
CUANTIFICACIÓN	60
<i>Resultados</i>.....	66
LA CAFEÍNA INDUCE LTP EN LAS SINAPSIS DE CA3-CA1.....	66
LA LTP _{CAF} ES INDEPENDIENTE DE RECEPTORES DE GLUTAMATO TIPO NMDA	68
EN LA LTP _{CAF} NO PARTICIPA LA INHIBICIÓN MEDIADA POR RECEPTORES GABAÉRGICOS	70
EN EL MANTENIMIENTO DE LA LTP _{CAF} PARTICIPAN MECANISMOS DE ORIGEN POSTSINÁPTICOS.....	71
LA CAFEÍNA PROMUEVE LA SECRECIÓN DE BDNF EN RODAJAS DE HIPOCAMPO	72
LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR PI3K ES NECESARIA PARA EL MANTENIMIENTO DE LA LTP _{CAF}	76
LA CAFEÍNA INCREMENTA LA ACTIVIDAD RÍTMICA PROVOCADA POR ESTÍMULOS SOMÁTICOS.....	78
LA CAFEÍNA PRODUCE UNA SINCRONIZACIÓN DE LOS RITMOS THETA HIPOCAMPALES EN ANIMALES DESPIERTOS	81
EL AUMENTO DE ACTIVIDAD RÍTMICA PRODUCIDO POR LA CAFEÍNA ES BLOQUEADO POR EL ANTAGONISMO DE TrkB .	83
<i>Discusión</i>	88
SECRECIÓN DE BDNF EN RESPUESTA A LA CAFEÍNA.....	90
ACCIONES DE LA SEÑALIZACIÓN BDNF/TRKB <i>IN VITRO</i>	92
TrkB COMO DETECTOR DE COINCIDENCIA	94
LA CAFEÍNA MODIFICA LA ACTIVIDAD RÍTMICA DEL HIPOCAMPO A TRAVÉS DEL RECEPTOR TrkB.....	97
<i>Conclusiones</i>	102
<i>Bibliografía</i>.....	106



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi director de Tesis, el Dr. Eduardo Martín, todo el tiempo destinado a llevar a cabo este trabajo, su dedicación para que todo avanzara y, sobre todo, la tremenda oportunidad que me dio al incluirme en su grupo de trabajo. Gracias por las enseñanzas, en la ciencia y en la vida, por la paciencia y por el apoyo prestado. Siempre es un placer compartir experiencias de trabajo y de ocio con una persona tan interesante. Mis más sinceras gracias, Eduardo.

No quiero dejar pasar la oportunidad de agradecer por su compañía, su compañerismo y por su amistad, a mis compañeras de laboratorio, de jornadas y semanas largas y arduas, de fines de semana demasiado cortos, de conciertos, conciertillos y saloncitos, de charlas efímeras y discusiones transcendentales, de buenos momentos y momentos casi buenos. Primero, a Ita, por ser mi *freetour* del laboratorio cuando llegué y hacerse cargo de mostrarme cómo funciona, en el día a día, esto de la electrofisiología. Por mantenerse siempre ahí, dispuesta a ayudar. A ti que eres una persona fuerte donde las haya, perseverante hasta el desmayo, sigue siempre fiel a tu manera de ser, digan lo que digan, porque eso te llevará lejos, a donde quiera llegar. Segundo, a Bea, que llevando tan poco entre nosotros se ha hecho un hueco tan grande, en la bancada y en nuestras vidas. Porque eres de las que no cejan en sus empeños, y que sacas adelante tantas cosas como te propongas, cárgate de seguridad, sube siempre al palo más alto, y desde ahí busca el siguiente horizonte. Con tu valía, ninguno estará nunca lo suficientemente lejos.

Por supuesto, necesito agradecer a Jose Ignacio, Emilia, Elena, Chus, Albert y Ana, por su ayuda, cada cual en su ámbito. Jijí me abrió las puertas de su persona y de Albacete desde el *primerito* día, lo que significa que nunca podré agradecerle lo suficiente su altruismo, su compañía, su conversación y, en definitiva, su amistad. No está lejos el día en que alguien se dé cuenta de lo valioso que puedes llegar a ser en su laboratorio. Emilia, que eres el azúcar del miguelito, el miguelito de la Feria y la Feria de Albacete; a ti, gracias por ser tú. Te nos has ido una temporada para crecer profesionalmente, echándole valor y cogiendo el toro por los cuernos; eso

demuestra que nunca hay que dejar de luchar por lo que queremos hacer. Eres un ejemplo a seguir. Elenica, Elenica, para cuando estoy escribiendo esto has formado una familia y estas dando un vuelco a tu vida, no para ir a donde ésta te lleva, sino para llevarla a dónde tú quieres, por aquello que más quieres. Eres uno de esos pilares en los que cualquier aprendiz de mago se apoyaría para alcanzar su destino. No te deseo otra cosa más que en la nueva etapa encuentres las cosas buenas que te mereces. Y Chus, tú te estás forjando tu destino a base de mucho y buen trabajo. No sé si es obra de magia o de algún anillo de poder, pero estoy seguro de que el camino que estás tomando te deparará tantas y tan buenas historias como si así fuera. A Mr. Albert, el postdoc venido del norte que, cual mata de retama, ha echado sus raíces en La Mancha, convirtiéndose en altamente dependiente del sol y del clima albaceteño, tanto del meteorológico como del social. Eres un señor de convicciones firmes, con el que merece la pena pasar el rato charlando. Gracias por tu consejo y tu continua amabilidad. Ana (de Piet), tú eres la más reciente incorporación pero esa alegría que trajiste hace que parezca que siempre has estado aquí, porque ya no entenderíamos esto si nos faltase. Gracias por tu sinceridad siempre, sé que te queda mucho por hacer y que lo harás maravillosamente bien.

También quiero agradecer su compañía a los demás habitantes del CRIB, con los que he convivido más o menos tiempo y con los que he podido entablar más o menos relación: Pablo, Merce, Carol, Sole, Pedro, porque siempre se saca un ratito de disfrute y siempre he podido contar con vosotros si ha hecho falta. También a los jefes: Rafa, Piet, Antonio, Charo, Elena, porque para aprender algo nuevo cada día, lo mejor es tener un entorno de gente sabia.

En penúltimo lugar, no por ello con menos gratitud sino con menos palabras, porque hay sentimientos que no pueden sencillamente escribirse, quiero expresar todo mi amor hacia mis padres y mis hermanos. Lo único que puedo decir es que sin vosotros nada hubiese sido posible.

Y Ana, sin ti, todo hubiese sido un rollo. No lo cambio por nada. Gracias.



ABREVIATURAS

%NTP:	Porcentaje de energía normalizada.
A₁:	Receptores metabotrópicos de adenosina tipo 1.
A_{2A}:	Receptores metabotrópicos de adenosina tipo 2A.
AC:	Adenilato ciclasa.
ACSF:	Fluido cerebroespinal artificial.
Akt:	familia de serin/treonin-quinasas, también llamadas proteínas kinasas B (PKB).
AMPA:	Receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico.
AP:	Anteroposterior.
AP5:	Ácido 2-amino-5-fosfonovaleriánico, también llamado APV.
BDNF:	Factor neurotrófico derivado de cerebro.
CA:	Cuerno de Amón o <i>Cornus Ammonis</i> .
CaMKII:	Calcio-Calmodulina Kinasa tipo 2.
CS:	Colaterales de Schaffer.
CT:	Grupo experimental control.
DG:	Giro dentado.
DV:	Dorsoventral.
fEPSP:	Potenciales post-sinápticos excitatorios de campo.
FFT:	Transformada rápida de Fourier.
GABA:	Ácido γ -aminobutírico.
HFS:	Estimulación de alta frecuencia.
IRS:	Sustrato receptor de insulina.
KO:	<i>Knock-out</i> .
LTD:	Potenciación a largo plazo.
LTP:	Depresión a largo plazo.
LTP_{CAF}:	Potenciación a largo plazo inducida por cafeína.
MAPK:	Proteína kinasa activada por mitógeno.
ML:	Mediolateral.
NMDA:	Receptores de N-metil-D-aspartato.
NT-3:	Neurotrofina 3.
NT-4:	Neurotrofina 4.

PDK1:	Kinasa dependiente de 3-fosfatidilinosítidos tipo 1
PI3K:	Fosfoinositol-3 kinasa.
PKC:	Proteína Kinsasa C.
PLCγ:	Fosfolipasa C- <i>gamma</i> .
PPF:	Facilitación por pares de pulsos.
PTX:	Picrotoxina.
RYAN:	Riaodina.
STDP:	Plasticidad dependiente de cadencia de espigas, del inglés <i>spyke timing dependent plasticity</i>
TBST:	<i>Tris-buffered saline and tween 20</i> .
TEA:	Tetraetilamonio.
TrkB:	Receptor tirosina kinasa tipo B, o Receptor asociado a tropomiosina kinasa.
TTX:	Tetrodotoxina.
VGCC:	Canales de calcio activados por voltaje.
WT:	Fenotipo salvaje, o <i>wildtype</i> .

“[...] nos esse quasi nanos, gigantium humeris incidentes, ut possimus plura eis et remotiora videre, non utique proprii visus acumine, aut eminentia corporis, sed quia in altum subvenimur et extollimur magnitudine gigantea”

Somos como enanos a los hombros de gigantes. Podemos ver más, y más lejos que ellos, no por la agudeza de nuestra vista ni por la altura de nuestro cuerpo, sino porque somos levantados por su gran altura.

Juan de Salisbury, obispo, escritor y diplomático inglés, citando a su maestro, Bernardo de Chartres, filósofo.

INTRODUCCIÓN

Santiago Ramón y Cajal escribió:

“[...] que todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro, y que aun el peor dotado es susceptible, al modo de las tierras pobres, pero bien cultivadas y abonadas, de rendir copiosa mies”.

Lo hizo en el prólogo de una obra dirigida a los jóvenes científicos en 1898, derivada de un discurso el año anterior. Y es que Cajal ya hacía algunos años que había dado a conocer su hipótesis sobre la gimnasia cerebral. En 1892, en su primera revisión sobre la organización nerviosa, escribía:

“[...] podría suponerse que la gimnasia cerebral, ya que no puede producir células nuevas [...] lleva un poco más allá de lo corriente el desenvolvimiento de las expansiones protoplasmáticas y colaterales nerviosas, forzando el establecimiento de nuevas y más extensas conexiones intracorticales”.

De manera que él estaba convencido de que era necesario cultivarse, tanto física como mentalmente, para alcanzar un desarrollo pleno. Así lo expresaba, metafóricamente, en 1894:

“Si no temiéramos abusar de las comparaciones, defenderíamos nuestra concepción diciendo que la corteza cerebral semeja un jardín poblado de innumerables árboles, las células piramidales, que gracias a un cultivo inteligente pueden multiplicar sus ramas, hundir más lejos sus raíces y producir cada día flores y frutos más exquisitos”.

Por tanto, y a diferencia de la opinión científica de la época, él consideraba que el cerebro era susceptible al cambio a través de la experiencia, no algo estático. Por primera vez hacía referencia al término “plasticidad” en la neurociencia:

“La corteza cerebral ha conservado su plasticidad de crecimiento, su fuerza de diferenciación interna para acomodarse a las crecientes, y de cada día más complicadas necesidades de la lucha por la vida [...]”.

Cajal aventuró estas hipótesis tras haber estudiado profundamente la creciente complejidad estructural de las células piramidales en la ontogenia y filogenia animal (De Felipe Oroquieta *et al.*, 2010) y se apoyaba en la doctrina neuronal, que permitía conceptualizar con la idea de cambio individual en las neuronas.

Ciento veinte años más tarde, la plasticidad neuronal está en auge en toda la neurociencia, desde la anatomía hasta la neuroingeniería. Sabemos que ocurre en el neocórtex, en estructuras arquicorticales como el hipocampo, subcorticales e incluso en la médula espinal. Se sabe también que en la plasticidad no solo interviene la creación y desarrollo de nuevos contactos, sino que la modificación y silenciamiento de los ya existentes son claves para el correcto desarrollo cognitivo.

Gracias al desarrollo de las técnicas electrofisiológicas, capaces de cuantificar y modificar la función neuronal, se describió el primer fenómeno de plasticidad sináptica mantenido a largo plazo en el hipocampo (Bliss y Lomo, 1973). Desde entonces se ha afianzado el concepto de que la plasticidad sináptica es el sustrato celular del aprendizaje y la memoria (Martin *et al.*, 2000; Kandel, 2001) y la investigación en el hipocampo ha sido clave en este proceso, a todos los niveles. Actualmente, continuamos profundizando en los mecanismos genéticos que hacen

posible la plasticidad, los aspectos morfo-funcionales implicados y la relevancia fisiológica y patológica que puede tener.

Ahora que sabemos que el cerebro es moldeable podemos comenzar a comprender cómo se modifica patológicamente y la forma de evitar esos cambios.

EL HIPOCAMPO

El hipocampo es una estructura cortical, desarrollada desde el palio medio en todos los vertebrados. El hipocampo propiamente dicho es realmente una parte de la formación hipocampal que, en el ratón, se extiende rostro-caudalmente y se curva dorso-ventralmente, adquiriendo forma de plátano. Toda la formación hipocampal tiene estructura de arquicorteza y está formada por el Giro Dentado (DG) y el Cuerno de Amón (*cornus ammonis*, CA) el cual se subdivide en cuatro subáreas (CA1-CA4). A efectos de este trabajo se considerarán las dos más claramente diferenciables, CA3 y CA1, como hipocampo propiamente dicho.

Toda la estructura tiene una disposición trilaminar (Fig. 1). La capa principal de DG es la capa granular y las capas adyacentes son la capa molecular y el *hilus* (o capa multiforme). En CA la capa celular se denomina *stratum pyramidale*, limitada por el *stratum oriens* y los *strata radiatum-lacunosum* (con ligeras diferencias según se hable de CA3 o CA1). Entre estas estructuras existe una conectividad relativamente simple y conocida, que ha convertido al hipocampo en un modelo de estudio muy extendido. Las principales células son las neuronas piramidales, situadas en el *stratum pyramidale* de todo CA. De soma grande, glutamatérgicas, cuentan con dos arborizaciones dendríticas, una apical hacia el *stratum radiatum* y otra basal hacia el *stratum oriens*, y un axón. En el DG las principales neuronas son

las células granulares, también excitadoras, y que poseen un árbol dendrítico en la capa molecular y axones que se dirigen a CA3.

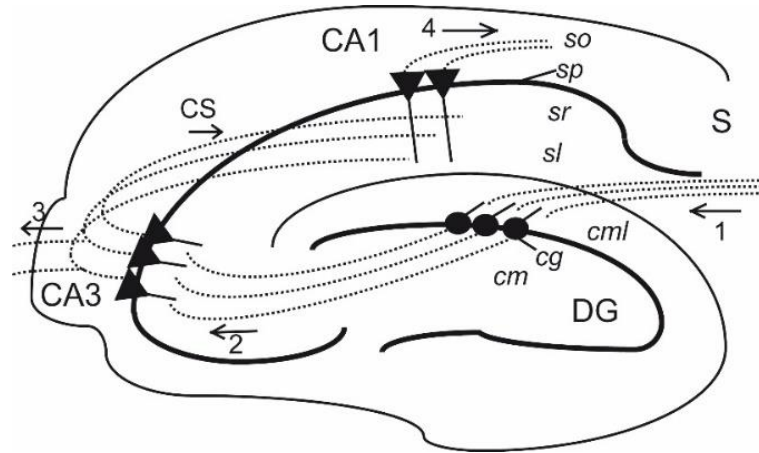


Figura 1. Esquema de la formación hipocampal. El giro dentado (DG) y el Cuerno de Amón (CA3-CA1) conforman la formación hipocampal en la que se observan las siguientes capas: capa molecular (cml), capa granular (cg) y capa multiforme (cm) en el DG, y *stratum oriens* (so), *stratum pyramidale* (sp), *stratum radiatum* (sr) y *stratum lacunosum* (sl) en CA1. Las líneas punteadas representan las principales conexiones que conforman el circuito trisináptico (ver texto) del hipocampo: 1, vía perforante; 2, fibras musgosas; 3, proyecciones hacia el hipocampo contralateral, CS: Colaterales de Schaffer; 4: axones de proyección desde CA1 al Subículo (S).

Entre DG y CA se forma el llamado circuito trisináptico del hipocampo (Figs. 1 y 2). Este comienza con las aferencias principales que provienen de la corteza entorrinal y alcanzan, sobre todo, las dendritas de las células granulares del DG (también CA3 y CA1) a través de la vía perforante. Las células granulares envían sus axones (llamados fibras musgosas) a CA3, contactando con las dendritas apicales de las células piramidales. Los axones de estas se dirigen a CA1 de los lados ipsi y contralateral a través de las colaterales de Schaffer (CS) y el fórnix, respectivamente. Las CS alcanzan las dendritas apicales de las piramidales de CA1

a la altura del *stratum radiatum* y, finalmente, la mayoría de fibras parten desde aquí hacia el subículo y la corteza entorrinal (Fig. 2).

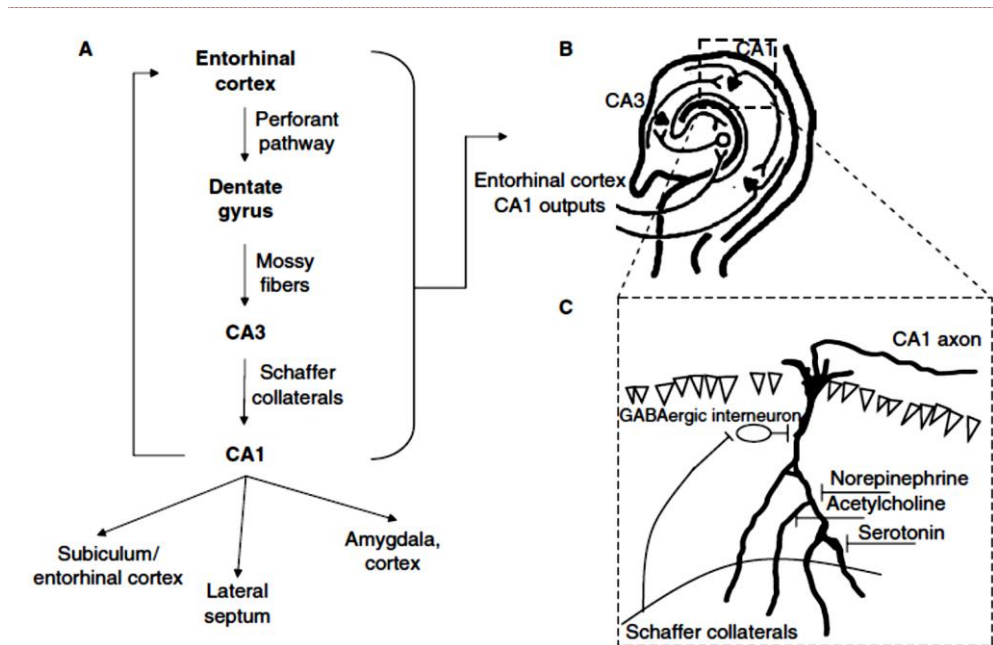


Figura 2. Conexiones intrínsecas y de proyección hipocampales. A) La corteza entorrinal (*Entorrhinal cortex*) contacta con la formación hipocampal (DG, CA3, CA1) a través de la vía perforante (*perforant pathway*). El circuito trisináptico, de flujo unidireccional, finaliza en CA1, desde donde se envían las proyecciones al subículo y la corteza entorrinal, cerrando el bucle; pero también a otras estructuras corticales de asociación y parahipocampales (*cortex*) y subcorticales (*Amygdala, Lateral septum*). B) Disposición anatómica del circuito trisináptico. C) Detalle de CA1, que posee su propia circuitería excitadora/inhibidora (*Schaffer collaterals/GABAergic interneurons*), pero también recibe aferencias desde el núcleo del rafe medial (*Serotonin*), el Septum (*Acetylcholine*) y el *locus coeruleus* (*Norepinephrine*). Tomado de Sweatt, 2010.

En cuanto a la conectividad externa, además de las aferencias desde la corteza entorrinal, otras estructuras envían fibras a esta formación, por ejemplo la amígdala, que proyecta al subículo, el *septum*, que envía axones colinérgicos a CA1 (Teles-Grilo Ruivo y Mellor, 2013), el *locus coeruleus* que envía proyecciones noradrenérgicas (Loy *et al.*, 1980) y algunos núcleos del rafe con proyecciones serotoninérgicas (Azmitia, 1981). Esto indica que existe una regulación muy

importante de la función hipocampal tanto desde áreas corticales, como desde áreas subcorticales (Fig. 2). El hipocampo proyecta principalmente las fibras desde CA1, que además del subículo, alcanzan los núcleos mamilares y el tálamo anterior. Otras fibras se distribuyen hacia los núcleos septales, la corteza pre-frontal, el hipotálamo y el núcleo *accumbens*.

Aunque las principales conexiones son glutamatérgicas, existen diversas poblaciones de interneuronas que utilizan el neurotransmisor GABA (ácido γ -amino-butírico), formando parte de los circuitos locales (Fig.2). Además de esta inhibición, es de gran importancia el sistema regulador formado por fibras serotoninérgicas, adrenérgicas y colinérgicas. Además, distintas moléculas como, por ejemplo, la adenosina, pueden actuar tónicamente a nivel sináptico regulando la función hipocampal (Svenningsson *et al.*, 1997; Dunwiddie y Masino, 2001).

LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE EN EL HIPOCAMPO

El hipocampo, de manera clásica, ha sido asociado con la génesis y procesamiento de las emociones integrándolo dentro del sistema límbico. Sin embargo, en los últimos tiempos se ha considerado como un área crítica y necesaria para la formación del proceso mnémico, funcionando como mediador entre la adquisición de las nuevas experiencias (asociadas sobre todo a la codificación del emplazamiento espacial y la memoria episódica) y su transmisión a las estructuras donde serán consolidadas. Sí es cierto, no obstante, que existe una fuerte interconexión con el componente emocional que acompaña a la información, lo que mantiene el concepto de integración hipocampal con el sistema límbico (Phelps, 2004; Eichenbaum y Cohen, 2014).

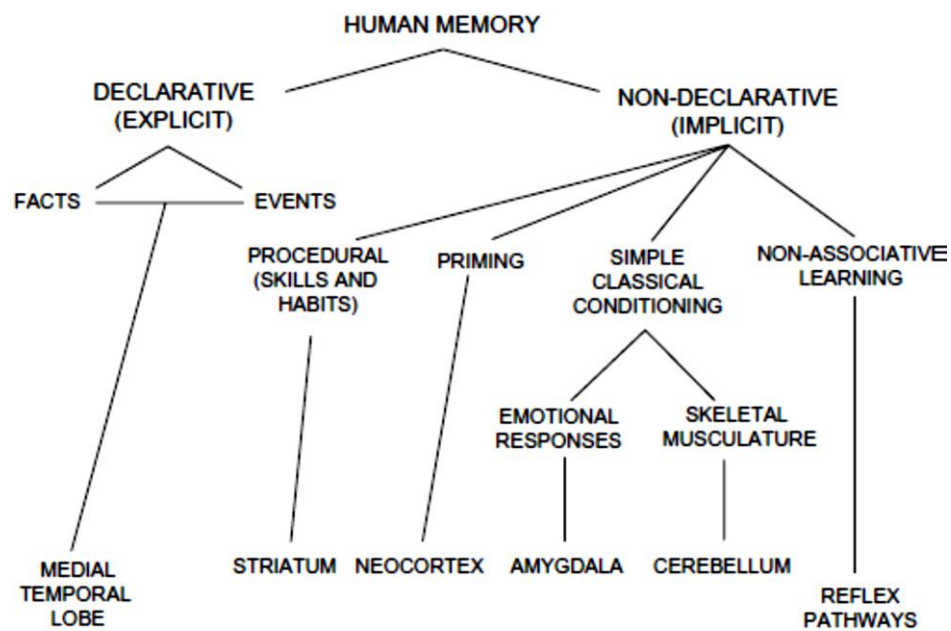


Figura 3. Clasificación de los tipos de memoria. La clasificación responde a las propuestas de Squire y Kandel, recogidas por Sweatt (Sweatt, 2010) y se acompaña de las estructuras relacionadas con ellas. En este trabajo nos referiremos con “memoria y aprendizaje” a la de tipo declarativo o explícito (*Declarative, Explicit*), relacionada con el aprendizaje consciente y su procesamiento por las estructuras del lóbulo temporal medial en humanos, al que pertenece el hipocampo, y las cortezas perirrinal y entorrinal. Tomado de Sweatt, 2010.

Las memorias episódica y espacial son dos de los tipos que podemos considerar, dentro de las clasificaciones que se manejan a día de hoy (Fig. 3) (Sweatt, 2010). Ambas se encuadran dentro de las que Sweatt denomina (en términos humanos de consciencia o inconsciencia del proceso cognitivo implicado), como consciente/inconsciente/consciente refiriéndose a las fases de aprendizaje, almacenamiento y recuperación, respectivamente. En un sentido más ampliamente aceptado son de carácter explícito o declarativo, como considera Kandel (Kandel, 2001). Este tipo de memorias están codificadas por el hipocampo y las cortezas perirrinal y entorrinal, aunque su almacenamiento se lleva a cabo en las cortezas temporales.

Para comprender las bases biológicas de la memoria y el aprendizaje en el hipocampo, habría que destacar dos de los fenómenos electrofisiológicos más estudiados dentro de este campo que son la potenciación sináptica a largo plazo y la actividad rítmica hipocampal.

PLASTICIDAD SINÁPTICA

Podemos definir a la plasticidad sináptica cómo el fenómeno que permite modificar las conexiones sinápticas en base a la actividad neuronal (Martin *et al.*, 2000; Kandel, 2001). La plasticidad sináptica engloba procesos de creación, eliminación y modificación de sinapsis, tanto a nivel morfológico como funcional, pudiendo ocurrir a través de diferentes mecanismos. De todos los descritos en la literatura, nos detendremos a profundizar en la llamada potenciación sináptica a largo plazo.

POTENCIACIÓN SINÁPTICA A LARGO PLAZO

Uno de los modelos de plasticidad sináptica más ampliamente estudiados es el de potenciación a largo plazo, o LTP (del inglés *long term potentiation*). Se llamó así al proceso por el cual las sinapsis de la vía perforante incrementaban su eficacia en la transmisión sináptica tras una serie de estímulos tetánicos, incrementando la respuesta de las neuronas granulares del giro dentado de manera duradera (Bliss y Lomo, 1973). Desde entonces se obtuvieron sólidas evidencias experimentales que confirmaron los postulados del reforzamiento sináptico y aprendizaje asociativo y no-asociativo (Bailey *et al.*, 2000) y la LTP se consolidó como un modelo del sustrato celular del aprendizaje (Bliss y Collingridge, 1993). También se ha descrito un fenómeno de depresión a largo plazo (LTD), de similar naturaleza, pero que conduce a la disminución de eficacia sináptica (Dudek y Bear, 1992).

La LTP y su relación con el aprendizaje han sido descritas en diversidad de estructuras cerebrales, desde las sinapsis entre CA3 y CA1 (Gruart *et al.*, 2006; Whitlock *et al.*, 2006), hasta la corteza (Monfils y Teskey, 2004), pasando por la amígdala (Rogan *et al.*, 1997). Los procesos de LTP pueden desarrollarse a través de dos mecanismos moleculares diferenciados, según exista, o no, una dependencia de la actividad de los canales de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) en su inducción.

LTP NMDA-DEPENDIENTE

La LTP dependiente de NMDA ha sido ampliamente estudiada en CA1 a través del protocolo de inducción por estimulación a alta frecuencia, o HFS (del inglés *high frequency stimulation*), entre otros. Con este protocolo se provoca la liberación masiva de glutamato desde los botones presinápticos, que actúa sobre los receptores de AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropiónico) y NMDA postsinápticos (Bliss y Collingridge, 1993; Shapiro y Eichenbaum, 1999). Los canales de NMDA en reposo se encuentran bloqueados por el ion magnesio que sólo es liberado cuando existe una despolarización suficiente de la membrana postsináptica. Una vez se consigue desprender el ion magnesio, la unión del glutamato es capaz de abrir el canal, selectivo para calcio. Debido al carácter tetánico de la estimulación, la despolarización necesaria se consigue mediante la gran actividad generada a través de los canales AMPA, así como por la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs). También, es posible lograrlo mediante la estimulación de otras vías o de las fibras post-sinápticas directamente, que generen una despolarización coincidente con la primera (STDP, del inglés *spike timing dependent plasticity*). Por este motivo los canales de NMDA se

consideran “detectores de coincidencia” entre la actividad presináptica y una despolarización postsináptica (Malenka, 1991; Malenka y Nicoll, 1993).

La apertura de los canales NMDA genera un flujo aun mayor de calcio hacia el interior de la espina dendrítica (Malenka *et al.*, 1988) que activa las vías de señalización mediadas principalmente por la enzima calcio-calmodulina kinasa II (CaMKII) (Selcher *et al.*, 1999), PKC (Proteína Kinasa C) (Serrano *et al.*, 2005) y la MAPK (Proteína Kinasa Activada por Mitógenos) (Sweatt, 2004) que provocan cambios morfológicos y funcionales para incrementar la eficacia en la transmisión sináptica. Dichos cambios pueden ocurrir a corto plazo, como el incremento del número de receptores AMPA expresados en la membrana (Nicoll y Malenka, 1999), o a más largo plazo, como la síntesis de nuevas proteínas (Frey *et al.*, 1988; Frey y Morris, 1997).

LTP NMDA-INDEPENDIENTE

Los fenómenos de LTP NMDA-independientes son los que no están mediados por la apertura de canales de NMDA. Inicialmente, la idea de que debía existir un mecanismo alternativo al mediado por NMDA surgió del estudio de la sinapsis de las fibras musgosas donde la dotación de dichos canales era menor que, por ejemplo, en la vía perforante y, sin embargo, la LTP se producía de igual manera (Harris y Cotman, 1986). La LTP independiente de receptores NMDA puede ser inducida no solo por distintos protocolos eléctricos sino, también, químicos, empleándose por ejemplo TEA (tetraetilamonio), acetilcolina o cafeína, que incrementan la eficacia de la transmisión sináptica en presencia de AP5 (ácido D-2-amino-5-fosfopentanoico), un antagonista específico del receptor de NMDA

(Huang y Malenka, 1993; Hanse y Gustafsson, 1994; Martín y Buño, 2003; Fernandez de Sevilla *et al.*, 2008). La inducción de LTP no dependiente de NMDA producida por cafeína (LTP_{CAF}) (Martín y Buño, 2003; Martín y Buño, 2005), consiste en aplicar un pulso de cafeína en alta dosis (en el rango milimolar) a rodajas de hipocampo, sin variar las condiciones de estímulo eléctrico. Esto genera un rápido aumento en la eficacia sináptica caracterizada por un incremento de la probabilidad de liberación de neurotransmisor a nivel presináptico, que se estabiliza y se mantiene a largo plazo (Martín y Buño, 2003). En estas condiciones, la cafeína bloquea los receptores de adenosina A₁ además de promover, simultáneamente, la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares presinápticos sensibles a rianodina (Dunwiddie y Masino, 2001; Martín y Buño, 2003) lo que aumenta la probabilidad de liberación de glutamato, manteniendo este tipo de LTP (Martín y Buño, 2003; Martín y Buño, 2005; Lao-Peregrín, 2012)

LA ACTIVIDAD RÍTMICA EN EL HIPOCAMPO

Distintas evidencias experimentales indican que la red neuronal del hipocampo genera una actividad rítmica con determinados tipos de oscilaciones concretas en función del estado cognitivo del animal (Gray, 1994; Girardeau *et al.*, 2009; Belchior *et al.*, 2014). Específicamente, las denominadas ondas Theta, o ritmo Theta, están relacionadas con los fenómenos de aprendizaje (Jurado-Parras *et al.*, 2013), memoria espacial (Buzsaki y Moser, 2013), codificación del emplazamiento espacial (Harvey *et al.*, 2009) y la toma de decisiones (Belchior *et al.*, 2014). La actividad Theta se caracteriza por mostrar una serie de oscilaciones sinusoidales con una frecuencia característica que varía, según diferentes autores, entre los 4 y 10Hz (Gray, 1994), o entre los 5 y 12Hz (Belchior *et al.*, 2014) en animales

despiertos. Los mecanismos que se proponen como responsables de la aparición de este tipo de actividad incluyen cambios en las propiedades intrínsecas de las neuronas piramidales o modificaciones de la actividad colinérgica y GABAérgica de las proyecciones desde el *septum* (Buzsaki, 2002; Hu *et al.*, 2002). Parece claro que en la aparición de esta actividad rítmica participa el circuito formado por la corteza entorrinal, DG y CA (Gray, 1994; Buzsaki y Moser, 2013). Estas estructuras están relacionadas, además, con otras clases de actividad rítmica como la actividad Gamma (en el rango de los 30-100Hz) o las denominadas *Sharp Waves*, centradas en torno a los 200Hz (Gray, 1994; Girardeau *et al.*, 2009; Lisman y Jensen, 2013), permitiendo la sincronización necesaria para la consolidación del aprendizaje espacial y contextual (Tort *et al.*, 2009). Más aún, desde hace tiempo se sabe que la inducción de LTP por medio de HFS se ve favorecida por la sincronización del tren con las fases positivas de las oscilaciones Theta (Holscher *et al.*, 1997), así como que los sistemas de transmisión serotoninérgico (Staubli y Xu, 1995) y colinérgico (Fisahn *et al.*, 1998) están relacionados con la modulación de la actividad rítmica, por lo que realmente existe una conexión entre los modelos celulares de aprendizaje y la actividad rítmica observada en dichos procesos.

LA ADENOSINA EN EL HIPOCAMPO

La adenosina en el hipocampo actúa como un modulador inhibitor tan importante como el propio sistema GABAérgico (Svenningsson *et al.*, 1997; Dunwiddie y Masino, 2001). La adenosina es agonista de los receptores metabotrópicos A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, que se encuentran distribuidos en distinta proporción por todo el cerebro (Dunwiddie y Masino, 2001). Sin embargo, debido a la diferente afinidad de cada uno de ellos por la adenosina, se admite que en condiciones fisiológicas la

interacción se produce principalmente sobre los receptores de tipo A₁ y A_{2A} (Fredholm *et al.*, 1999).

Los receptores A₁ se distribuyen principalmente en el hipocampo y la corteza, mayoritariamente a nivel presináptico, y se asocian a proteínas G_{i/o}, inhibitorias de adenilato ciclasa (AC) y de canales de potasio, y activadoras de las fosfodiesterasas C y D. La acción principal de esta clase de receptores es disminuir la entrada de calcio al terminal sináptico, a través de los canales tipo N, en las áreas CA3 y CA1 hipocámpales (Scholz y Miller, 1992; Mogul *et al.*, 1993). De esta manera la adenosina, cuando actúa a través de los receptores A₁, modula la probabilidad de liberación de glutamato, reduciéndola a medida que la adenosina aumenta su concentración. La acción depresora de la transmisión sináptica mediada por la adenosina tiene efectos de gran importancia en otras estructuras cerebrales, como la inducción del sueño (Porkka-Heiskanen *et al.*, 1997), necesaria para el correcto funcionamiento del organismo. Resulta interesante plantearse que la adenosina afecta, en el hipocampo, a los mecanismos relacionados con la memoria y el aprendizaje (Moore *et al.*, 2003) y que, de hecho, los seres humanos hemos tratado de contrarrestar ambos efectos consumiendo antagonistas naturales, como la cafeína, en una amplia diversidad de formas.

LA CAFEÍNA COMO COMPUESTO PSICOTRÓPICO

La alteración de la dinámica de interacción de la adenosina con sus receptores en el organismo es una práctica que ha estado llevándose a cabo por la humanidad desde hace cientos de años de manera empírica, a través del consumo de café y otras metilxantinas. No es hasta el año 1819 que el químico alemán Friedrich F. Runge aísla

y nombra el compuesto como *Kaffein*. Posteriormente sería Hermann E. Fischer el primero en determinar su estructura completa como parte del trabajo de síntesis de azúcares y purinas que le llevaría a obtener el premio Nobel en 1902. Hoy en día nuestra sociedad asume el consumo de cafeína como algo habitual y, de hecho, es considerada como el compuesto psicoactivo más utilizado del mundo (Fredholm *et al.*, 1999). Por ejemplo, el consumo medio en Estados Unidos es de unos 300 mg/día (Laszlo, 2010) y en Europa se estima que hasta un tercio de la población consume a diario unos 400 mg (Zucconi *et al.*, 2013).

Desde hace muchos años se investigan los efectos de la cafeína tanto a nivel periférico como central. A nivel periférico, por ejemplo, afecta a la presión sanguínea y el ritmo cardíaco (Robertson *et al.*, 1978). A nivel central, los efectos más obvios son los de reducción (o retraso) de la necesidad de sueño y el incremento del estado de alerta, ambos claramente aceptados y ampliamente descritos por pacientes y sujetos de estudio (Loke, 1988; Nehlig *et al.*, 1992). Algo que es importante reseñar, sin embargo, es la dualidad de efectos encontrados en cuanto a la concentración de cafeína se refiere. Sobre la actividad locomotora, por ejemplo, existe un patrón dosis-respuesta con forma de U invertida encontrándose que es a concentraciones bajas cuando se observan los efectos estimulantes, invirtiéndose la tendencia hacia efectos depresores a medida que la dosis aumenta (Fig. 4).

Si consideramos los hábitos sociales ya comentados previamente, el consumo habitual de cafeína no genera grandes problemas de salud en la mayoría de la población. Una concentración de cafeína en plasma de 5,5 mg/l se alcanza fácilmente con unas 3 tazas concentradas de café, lo que llevaría a picos de

concentración en el cerebro dentro de los rangos de acción estimulantes (Fredholm *et al.*, 1999). No obstante, se debe mencionar que actualmente existe una creciente preocupación en lo concerniente al consumo de cafeína, debido al auge de las llamadas bebidas energéticas (Reissig *et al.*, 2009).

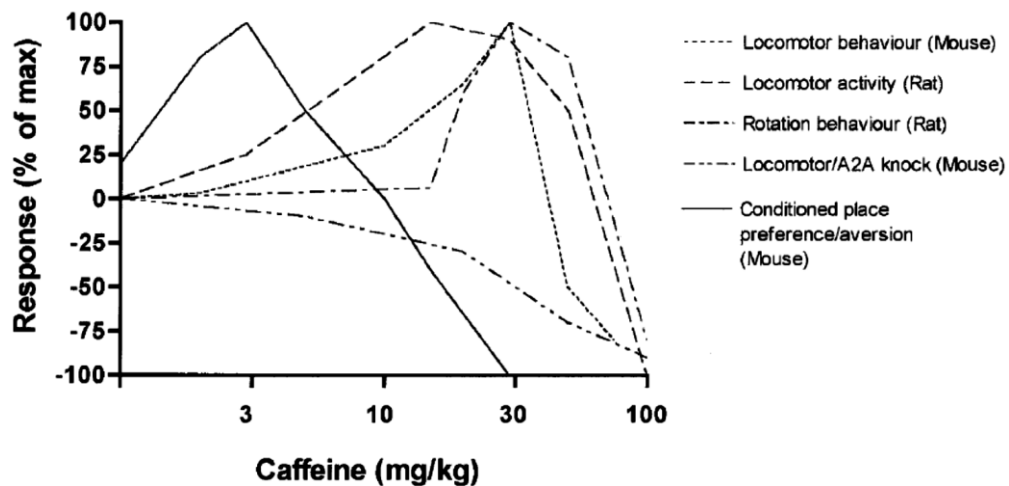


Figura 4. Efecto dual de la cafeína sobre la actividad locomotora en roedores. Varios ejemplos de efecto estimulante (respuesta, *response*, positiva) o depresor (respuesta negativa) en pruebas de locomoción en ratón WT (*Locomotor behaviour, Mouse*) y KO para A_{2A} (*Locomotor/A2A knock, Mouse*); rata (*Locomotor activity, Rat*); de rotación en rata (*Rotation behaviour, Rat*); y de condicionamiento en ratón (*Conditioned place preference/aversión, Mouse*). En general, en condiciones normales los roedores presentan un pico máximo de respuesta locomotora a dosis intermedias de cafeína. Tomado de Fredholm *et al.*, 1999.

Se admite que los efectos estimulantes de la cafeína se deben al antagonismo no selectivo de los receptores de adenosina (Nehlig *et al.*, 1992; Takahashi *et al.*, 2008), lo que sucede en el rango micromolar de concentración en el cerebro. Si nos desplazamos al rango milimolar, la cafeína actúa bloqueando los receptores de GABA, inhibiendo la actividad de fosfodiesterasas C y movilizando de manera masiva los reservorios intracelulares de calcio (Fredholm *et al.*, 1999). Si nos referimos al hipocampo, como ya se comentó, la liberación tónica de adenosina

actúa a través de A_1 y finalmente sobre de los canales de Ca^{2+} tipo N y de potasio. La cafeína, al actuar sobre los A_1 , tendría un efecto de liberación de este “freno” a la transmisión excitadora. Sin embargo, la cafeína también ejerce sus efectos a otros niveles, a través de los mismos A_1 (corteza) y de los A_{2A} (estriado, por ejemplo) y, además, el efecto dependerá de la actividad basal de adenosina existente en el sistema. Estos aspectos hacen que los efectos sobre el comportamiento y las capacidades cognitivas sea variados, y sus mecanismos de acción no del todo conocidos a día de hoy.

En ratas y ratones, el tratamiento con cafeína, por ejemplo, produce un incremento en la locomoción espontánea, donde se observa el comentado efecto bifásico (Fig. 4), encontrándose el umbral entre 1 y 3 mg/kg y el pico máximo entre 10 y 40 mg/kg (Nikodijevic *et al.*, 1993), disminuyendo el efecto estimulante de ahí en adelante. Para subrayar la importancia de los efectos de la cafeína se pueden mencionar algunas líneas de investigación que indican cómo la cafeína mejora la capacidad cognitiva tanto en animales como en humanos (Lieberman *et al.*, 1987; Durlach, 1998; Angelucci *et al.*, 2002). También en modelos animales, se ha observado que la cafeína estimula la actividad cortical e hipocampal y activa el ritmo Theta (Popoli *et al.*, 1987; Yoshimura *et al.*, 2002). En esta línea, varias xantinas con efecto antagonista de los receptores de adenosina promueven el desarrollo de fenómenos de potenciación a largo plazo, mientras que la adenosina los bloquea (Tanaka *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 2003). Dosis muy altas, por su parte, generan cambios en la actividad eléctrica semejantes a los que se observan en crisis epilépticas (Dunwiddie y Masino, 2001). Los efectos sobre estas estructuras corticales proporcionan las bases necesarias para investigar los posibles cambios que el

consumo de cafeína podría provocar sobre las funciones cognitivas, que han llevado a estudiar, por ejemplo, el rendimiento en tareas de discriminación visual (Borota *et al.*, 2014), observándose cambios en su realización.

A nivel celular se han encontrado cambios bidireccionales, en función de la concentración de cafeína, sobre la regulación de los llamados genes de expresión rápida como *c-fos* y *c-jun* (Johansson *et al.*, 1994; Svenningsson *et al.*, 1995b) y sobre los receptores huérfanos NGFI-A y NGFI-B, que disminuyen su expresión a dosis bajas, constituyendo una de las primeras pruebas de cambios moleculares producidos por dosis estimulantes de cafeína (Svenningsson *et al.*, 1995a). La regulación de varios de estos genes de expresión rápida está relacionada, además, con la señalización mediada por diferentes neurotrofinas, como la neurotrofina 3 (NT-3) y el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Nakagawara *et al.*, 1994), lo que nos lleva a destacar las investigaciones que sitúan al BDNF y su receptor específico como elementos fundamentales en la regulación de la transmisión sináptica.

EL SISTEMA BDNF-TrkB Y EL APRENDIZAJE

Las neurotrofinas son una familia de proteínas imprescindibles para el desarrollo del sistema nervioso al promover el crecimiento neuronal, su diferenciación, supervivencia y función (Chao, 2003). El descubrimiento del factor de crecimiento nervioso (NGF) por Rita Levi-Montalcini en los años 50 está considerado uno de los hechos más remarcables de la neurociencia del último siglo, valiéndole el Premio Nobel en 1986. Desde su descripción, se han encontrado varios miembros adicionales de esta familia: el factor neurotrófico derivado de cerebro, o BDNF y

las neurotrofinas 3 y 4 (NT-3 y NT-4). En el caso que nos ocupa, describiremos algunas de las características más relevantes del BDNF.

Las investigaciones señalan al BDNF como una de las principales claves en los procesos de plasticidad sináptica. El incremento en su concentración local se ha propuesto como mecanismo principal en la regulación del procesamiento de la información en el hipocampo (Aicardi *et al.*, 2004; Costenla *et al.*, 2010). El BDNF se sintetiza en forma de preproBDNF y es procesado a proBDNF el cual, también, puede secretarse y actuar sobre receptores específicos (Woo *et al.*, 2005). La forma madura (mBDNF) se adquiere en la red trans-Golgi mientras se dirige hacia las membranas (Lessmann *et al.*, 2003). La expresión de BDNF puede observarse en el hipocampo pero también en muchas otras estructuras como, por ejemplo, la corteza, la amígdala y el hipotálamo (Zhou *et al.*, 2004).

El BDNF es secretado constitutivamente por fusión vesicular espontánea, pero también puede ser secretado de manera activa por la llegada de estímulos externos (Woo *et al.*, 2005). *In vitro*, se ha conseguido provocar incrementos de la secreción de BDNF a través de protocolos de estimulación a alta frecuencia (Gartner y Staiger, 2002) o químicamente, aplicando glutamato, potasio a altas concentraciones o cafeína (Canossa *et al.*, 1997; Griesbeck *et al.*, 1999; Santi *et al.*, 2006). Una vez secretado, el BDNF actúa a través de la activación de su receptor específico de alta afinidad tirosin-kinasa tipo B (TrkB, también llamado receptor asociado a tropomiosina-kinasa) (Chao, 2003). Se sabe que esta señalización es clave en los fenómenos de aprendizaje ya que su disminución conlleva déficits en la memoria espacial (Minichiello *et al.*, 1999; Saarelainen *et al.*, 2000; Minichiello,

2009) y, por el contrario, la sobreexpresión de TrkB refuerza la consolidación de distintos tipos de memorias (Koponen *et al.*, 2004). Además, estudios recientes han puesto de manifiesto cómo el sistema BDNF-TrkB está implicado en la función hipocampal relacionada con la plasticidad neuronal mediada por el enriquecimiento ambiental (Novkovic *et al.*, 2015), que genera y promueve un amplio abanico de cambios en el cerebro de modelos animales (Duffy *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003).

Los receptores TrkB aparecen en un tercio de las neuronas glutamatérgicas del hipocampo en ratas, distribuidos a nivel pre y postsináptico (Pereira *et al.*, 2006). Son receptores monoméricos que al interaccionar con BDNF dimerizan y se autofosforilan en diversos residuos intracelulares. Están asociados a múltiples vías de señalización, incluyendo la de las MAPK y la de PI3K/Akt (Fosfatidilinositol-3 kinasa/Proteína Kinasa B), ambas iniciadas a través del reclutamiento de proteínas Shc e IRS (Sustrato Receptor de Insulina) (Minichiello, 2009); así como la de PLC γ (Fosfolipasa C-gamma) (Carvalho *et al.*, 2008), que puede interaccionar directamente con el receptor. Además, existen evidencias de que la activación de TrkB genera la apertura de canales iónicos, por interacción directa entre ellos, generando rápidas despolarizaciones de membrana (Kafitz *et al.*, 1999; Blum *et al.*, 2002). Dada la variedad de acciones consecuentes de la actividad de TrkB y las evidencias de que la cafeína es capaz de provocar la secreción de BDNF, resulta de interés comprobar de qué manera podrían estar estos hechos relacionados con la potenciación a largo plazo inducida por cafeína.



III

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

“To explain all nature is too difficult a task for any one man or even for any one age. 'Tis much better to do a little with certainty, & leave the rest for others that come after you, than to explain all things by conjecture without making sure of any thing”

Explicar toda la naturaleza es demasiado difícil para cualquier hombre o incluso para cualquier generación. Es mejor explicar un poco con certeza, y dejar el resto para los que vienen detrás, que explicarlo todo con conjeturas sin estar seguro de ninguna.

Isaac Newton, físico, matemático, astrónomo, inventor, alquimista, teólogo y filósofo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta las evidencias experimentales que indican que:

- 1) el BDNF, a través de su receptor TrkB, es un elemento clave en los procesos de plasticidad sináptica hipocampales,
- 2) la utilización de cafeína a altas concentraciones induce fenómenos de potenciación sináptica a largo plazo independientes de NMDA y la secreción de BDNF en cultivos,
- 3) existe una relación entre los fenómenos plásticos, la actividad rítmica cerebral y la codificación de memorias por el hipocampo,

planteamos como **objetivo general** de esta tesis doctoral estudiar los mecanismos celulares e intracelulares involucrados en la potenciación sináptica a largo plazo independiente de receptores de glutamato tipo NMDA mediada por cafeína (LTP_{CAF}) a dosis de consumo humano y su relación con la actividad rítmica del hipocampo. Este objetivo general se llevará a cabo a través de los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterizar los cambios plásticos sinápticos a largo plazo inducidos por la cafeína a dosis de consumo en las sinapsis glutamatérgicas de la región de CA1 del hipocampo.
2. Determinar el papel de la vía de señalización mediada por BDNF y su receptor TrkB en la LTPCAF y establecer si el receptor TrkB actúa como

detector de coincidencia entre la actividad pre y postsináptica en esta forma de potenciación.

3. Estudiar las vías intracelulares de señalización implicadas en el mantenimiento de la LTP mediada por cafeína a través del receptor TrkB.
4. Investigar la acción de la cafeína y la participación del receptor TrkB sobre la actividad rítmica hipocampal relacionada con los fenómenos de aprendizaje y memoria.



IV

MATERIALES Y MÉTODOS

“Equipped with his five senses, man explores the universe around him and calls the adventure Science”

Equipado con sus cinco sentidos, el hombre explora el universo a su alrededor y llama a la aventura Ciencia.

Edwin P. Hubble, astrónomo.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Para el trabajo experimental se utilizaron ratones silvestres de las cepas C57BL/6NRj y RjHan:NMRI (Janvier Labs, Francia), así como ratones heterocigotos BDNF^{+/-} cedidos gentilmente por la Dra. Esther Pérez (Universidad de Barcelona), de linaje C57BL/6NRj. Todos los animales utilizados fueron machos y tenían una edad de al menos 8 semanas. Los animales se mantuvieron en las instalaciones del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Castilla-La Mancha en condiciones adecuadas y fueron tratados de manera acorde a la normativa vigente a nivel comunitario (Directiva 2010/63/UE) y estatal (Real Decreto 53/2013).

FÁRMACOS Y REACTIVOS

A lo largo del trabajo experimental se requirió el uso de los compuestos especificados en el la Tabla 1: Fármacos y reactivos, al final de esta sección.

ELECTROFISIOLOGÍA *IN VITRO*

OBTENCIÓN DE RODAJAS DE CEREBRO

La obtención de las rodajas de cerebro se llevó a cabo por decapitación y exposición del encéfalo por craneotomía. El cerebro fue extraído y sumergido en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF, del inglés *artificial cerebrospinal fluid*) enfriado a 4°C. La composición del ACSF fue (en mM): 124 NaCl, 2,69 KCl, 1,25 KH₂PO₄, 2 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂ y 10 glucosa. El ACSF se mantuvo en continuo

burbujeo con gas carbógeno (95% O₂ - 5% CO₂) y ajustado a un valor de pH 7,34 ± 0,02 (Ph-meter Basic 20+, Crison, España). Tras su extracción, y de la manera más rápida posible, el cerebro se situó en la cubeta de corte del vibrátomo (Leica VT 1200 S, Leica Biosystems, Alemania) pegado a la plataforma extraíble y sumergido en ACSF frío (4°C) burbujeadado constantemente. Se procedió entonces a realizar un corte por su línea media y a obtener los cortes transversales de 400µm de espesor. Las rodajas obtenidas se transfirieron a las cámaras de incubación, donde se mantuvieron durante al menos una hora sumergidas en ACSF a temperatura ambiente y burbujeadas continuamente con carbógeno.

EQUIPO DE REGISTRO EXTRACELULAR IN VITRO

Los registros extracelulares se llevaron a cabo en un puesto de electrofisiología (Fig. 5) conectado a tierra y montado sobre una mesa flotante (VW-3030, Newport Corp., EE.UU) conectada a una bomba de aire (Model 3-4, JUN-AIR International, Dinamarca) para minimizar las vibraciones mecánicas. Todo el sistema se encontraba alojado dentro de una jaula de Faraday para disminuir las interferencias eléctricas que pudiesen afectar el registro. En la mesa se disponía la cámara de registro (de fabricación propia), dos micromanipuladores (Narishige International, EE.UU) y el estereomicroscopio (SZR-13, Optika SLR, Italia) transiluminado por una fibra óptica conectada a una fuente de luz (MLC-150C, Motic, Hong Kong). El sistema de perfusión estaba compuesto por dos vías de tubos Tygon de 1,42mm de diámetro (Cole-Palmer Instrument Company, USA), una de entrada y otra de salida, conectados a una bomba de perfusión continua (Minipuls 3, Gilson, Francia) situada fuera de la jaula. El ACSF se calentaba a la temperatura deseada mediante un sistema de calefacción (TC-324B, Warner Instruments, EE.UU) previo a la entrada

a la cámara de registro, controlada mediante un sensor de temperatura situado en la misma.

El sistema de registro estaba constituido por un electrodo monopolar de fibra carbono de $7\mu\text{m}$ ($0,4\text{--}1,2\text{M}\Omega$, Carbostar-1, Kation Scientific, EE.UU.) conectado a un amplificador (AC/DC Differential Amplifier 3000, A-M Systems, EE.UU.) y a un filtro activo de 50-60Hz (HumBug, Quest Scientific, Canada).

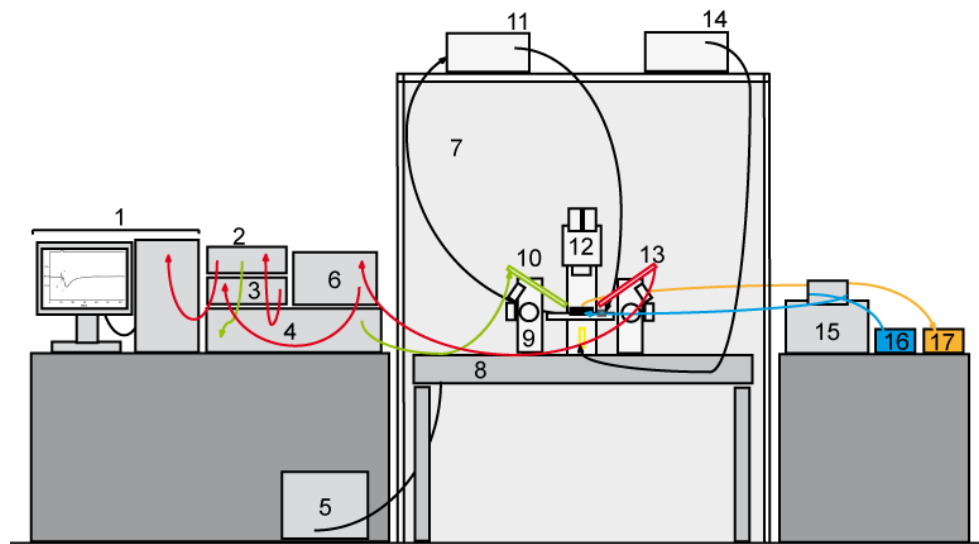


Figura 5. Esquema del sistema para el registro de actividad de campo *in vitro*. 1, Ordenador personal; 2, sistema de adquisición; 3, unidad HumBug; 4, estimulador; 5, bomba de aire; 6, amplificador; 7, caja de Faraday; 8, mesa flotante; 9, micromanipulador; 10, electrodo de estimulación; 11, sistema de calefacción; 12, estereomicroscopio; 13, electrodo de registro; 14, fuente de luz; 15, bomba de perfusión continua; 16, depósito de ACSF fresco; 17, depósito de residuos de perfusión.

La señal de registro se digitalizaba a través de un sistema de adquisición de datos (Powerlab 4/25T, ADInstruments, Nueva Zelanda) conectado a un ordenador personal, donde se visualizaba y almacenaba mediante el software Scope 3 (ADInstruments). El sistema de estimulación consistía en un electrodo bipolar de tungsteno con puntas de $5\mu\text{m}$ ($0,5\text{--}0,8\text{M}\Omega$, WPI, EE.UU.) conectado a un

estimulador (Isolated Pulse Stimulator 2100, A-M Systems, EE.UU) comandado a través del propio sistema de adquisición de datos o manualmente, según el tipo de protocolo de estimulación.

REGISTRO DE LA ACTIVIDAD DE CAMPO

Tras el período de incubación, la rodaja de cerebro era transferida a la cámara de registro, bajo un flujo constante (aprox. 2ml/min) de ACSF y sujeta por un par de pesas de plata para evitar el movimiento producido por el flujo. El electrodo de estimulación se colocaba en el *stratum radiatum* de la zona de CA1 sobre las colaterales de Schaffer. Por su parte, el electrodo de registro se situaba en una posición medial al anterior, sin profundizar en el tejido (Fig. 6), para obtener el potencial postsináptico excitador de campo (fEPSP) (Fig. 7).

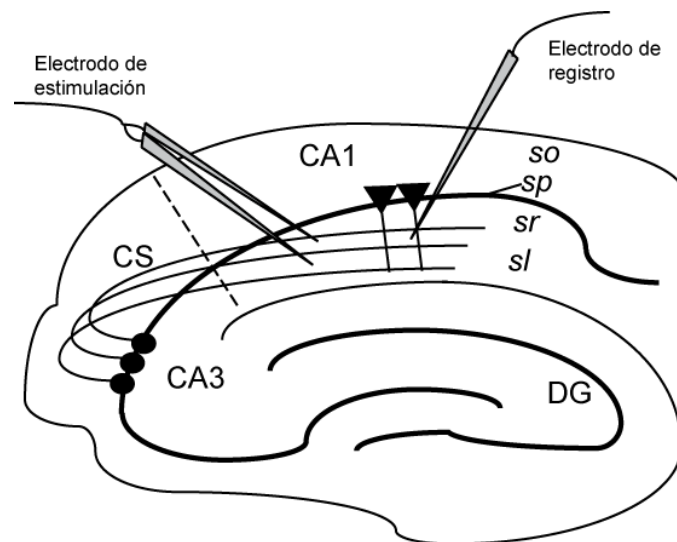


Figura 6. Diagrama de la posición de los electrodos sobre la rodaja de hipocampo. El electrodo de estimulación se situó sobre las colaterales de Schaffer en CA1 y el electrodo de registro medial al anterior, registrando la actividad de campo producida en el *stratum radiatum*. DG, *dentate girus*; CA3, *cornus ammonis* 3; CA1, *cornus ammonis* 1; CS, colaterales de Schaffer; so, *stratum oriens*; sp, *stratum piramidale*; sr, *stratum radiatum*; sl, *stratum lacunosum-moleculare*.

En primer lugar, se obtuvo una curva estímulo/respuesta (curva E/R) incrementando progresivamente la intensidad aplicada de 0 a 10V, a intervalos de 5 segundos, para establecer la transmisión sináptica excitatoria de campo basal del sistema (Fig. 8). Posteriormente, se estimuló a 0.33Hz durante el resto del experimento, registrando la respuesta generada a una frecuencia de muestreo de 40KHz por barrido. La intensidad de estímulo utilizada era la necesaria para alcanzar una respuesta del 40-50% de la respuesta máxima obtenida en la curva E/R. Se esperó hasta lograr un registro estable de al menos 10 minutos y se procedió a aplicar el protocolo de inducción de LTP, como se explica en el siguiente apartado. Tras la inducción, se realizaron registros continuos estimulando a 0.33Hz durante al menos 60 minutos.

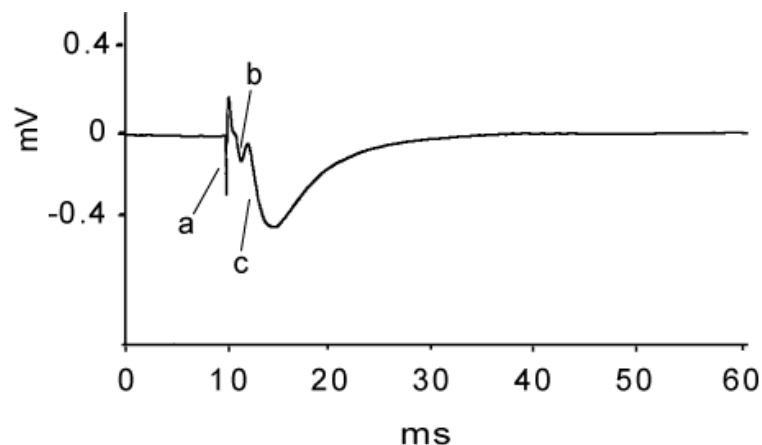


Figura 7. Registro típico de un fEPSP en *st. radiatum* de CA1. En el registro se distinguen el artefacto de estimulación (a), el potencial presináptico, b) y la curva resultante del sumatorio de los potenciales de campo excitatorios post-sinápticos, o fEPSP (c). El ejemplo mostrado es el resultado de promediar 5 registros consecutivos a una frecuencia de 0,33Hz.

El protocolo descrito fue aplicado igualmente a los experimentos en los que se realizaron los registros de actividad en presencia de distintos agonistas o antagonistas disueltos en el ACSF.

PROTOCOLOS DE INDUCCIÓN DE POTENCIACIÓN SINÁPTICA

Los protocolos utilizados para inducir la LTP fueron, por un lado, de naturaleza eléctrica y, por otro, de naturaleza química. La estimulación eléctrica se realizó mediante un protocolo de estimulación a alta frecuencia (HFS) conformado por cuatro trenes de pulsos cuadrados de un segundo cada uno, aplicados a una frecuencia de 100Hz y con un intervalo entre trenes de 20 segundos (Figura 9).

Por otro lado, se utilizó un protocolo químico mediante la disolución de cafeína en el ACSF a una concentración de 100 μ M. Se aplicó esta solución durante 5 minutos tras diez minutos de registro en condiciones basales, manteniendo la adquisición de la respuesta sináptica post-cafeína durante al menos 60 minutos. El tiempo de aclarado de la cámara de registro era de entre 15 y 20 minutos.

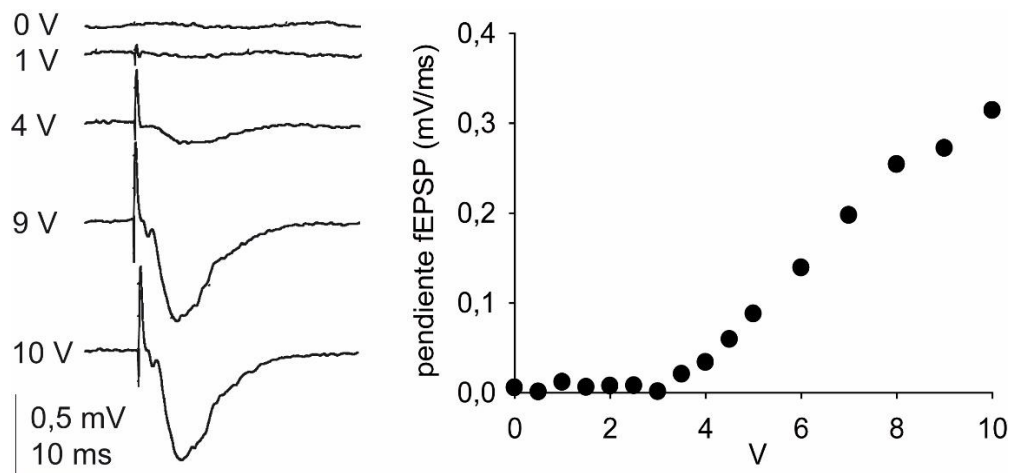


Figura 8. Registros y diagrama de la curva I/R. Los registros (izquierda) se obtienen estimulando a voltajes crecientes (0V-10V). En ellos se mide la pendiente inicial de la respuesta postsináptica excitatoria (fEPSP) correspondiente a cada voltaje y se representa como una curva de intensidad/respuesta (derecha).

ANÁLISIS DE LOS REGISTROS DE ACTIVIDAD DE CAMPO IN VITRO

De los registros obtenidos se calculó la pendiente del segmento inicial de los fEPSPs y su variación a lo largo del tiempo. Se promediaron los valores de las pendientes durante los diez primeros minutos de registro previos a la aplicación del protocolo de LTP, con el fin de obtener un valor basal de actividad (normalizados a un 100% de actividad sináptica). Los valores registrados durante todo el experimento se relativizaron a su vez frente a este valor basal y se expresaron en tanto por ciento de la misma (% basal fEPSP), como se observa en la Figura 10.

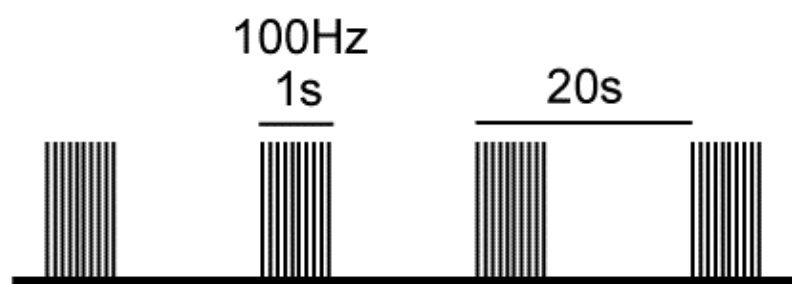


Figura 9. Protocolo de inducción eléctrica de LTP por HFS. Para inducir LTP clásica en las rodajas de hipocampo se utilizó el protocolo de estimulación de alta frecuencia consistente en cuatro trenes de un segundo de duración, separados por 20 segundos entre ellos, y compuestos por pulsos cuadrados a una frecuencia de 100Hz.

Los datos fueron representados utilizando el programa SigmaPlot 12 (Systat Software Inc.) y analizados estadísticamente con el programa Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Plus 2010, Microsoft Corporation). Los análisis estadísticos consistieron en comparaciones dos a dos mediante test T-Student de dos colas, suponiendo varianzas iguales o desiguales. El límite de rechazo de la hipótesis nula se estableció en 0,05. Para comprobar la existencia de diferencias significativas a raíz de la inducción de la LTP, se consideraron los valores de

pendiente de los fEPSPs en las siguientes situaciones: condición basal (a), a los cinco minutos del inicio del registro; inducción de la LTP (b), a los cinco minutos tras el protocolo aplicado; y el estado a largo plazo (c), a los 60 minutos de la inducción de la potenciación (Fig. 10).

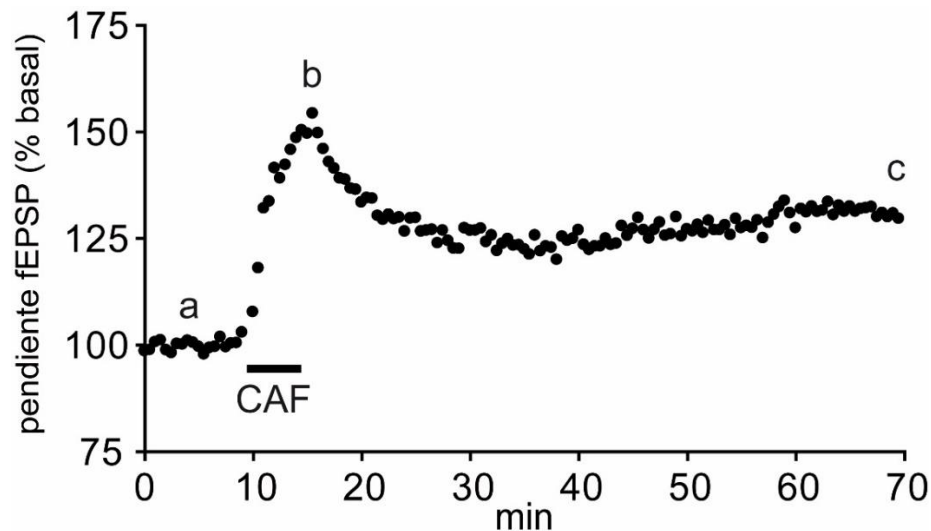


Figura 10. Curso temporal de la variación de la pendiente del fEPSP. En el ejemplo mostrado se observa la representación de los valores de la pendiente de los fEPSPs respecto del valor basal (pendiente fEPSP, % basal) frente al tiempo (min), registrado cada 30 segundos. El valor promedio de los diez primeros minutos se toman como nivel basal (a) relativizado al 100%. Tras este período de estabilización, se aplica el protocolo de LTP que proceda, en este caso cafeína 100 μ M durante cinco minutos (barra negra, CAF). Se procede entonces a estudiar su variación a los cinco minutos (b) y hasta los 60 minutos tras el inicio del estímulo (c).

FACILITACIÓN POR PARES DE PULSOS

Para determinar el origen pre o postsináptico de los fenómenos observados, en una serie de experimentos se llevó a cabo un estudio de facilitación por pares de pulsos (PPF), lo que nos indica, indirectamente, los cambios en la probabilidad de liberación de neurotransmisor a través de la observación de la respuesta postsináptica (Schulz *et al.*, 1994). Para ello, se aplicaron dos estímulos separados

por un intervalo de 50 milisegundos (Fig. 11) y se calculó la relación entre ellos utilizando la fórmula:

$$PPFratio = (P2 - P1)/P1$$

Siendo P1 el valor de la pendiente de la respuesta postsináptica al primer estímulo y P2 el valor de la pendiente de la segunda, y representándose gráficamente dicho *PPFratio*. Las diferencias estadísticas se establecieron mediante test de T-Student de dos colas, fijándose el umbral de rechazo de la hipótesis nula en 0,05.

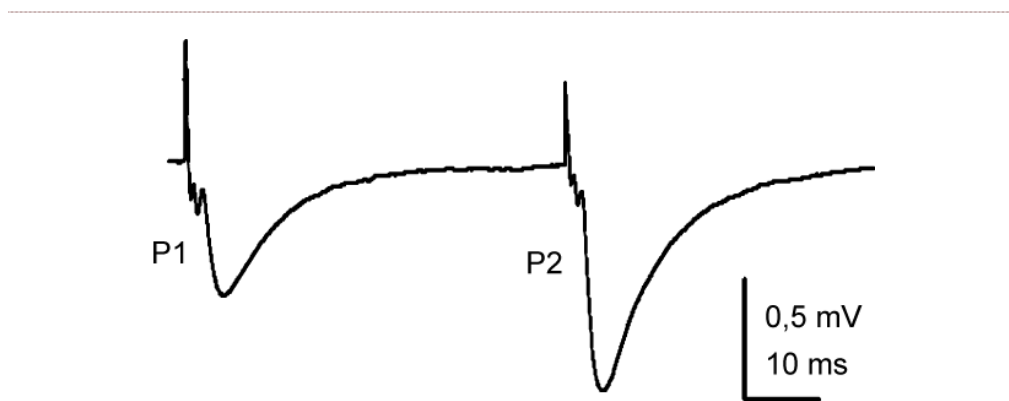


Figura 11. Facilitación por pares de pulsos. En el ejemplo mostrado se utiliza un intervalo interestímulo de 50ms en el que se observa una facilitación de la transmisión sináptica reflejada en el aumento de los valores de amplitud y pendiente en la segunda respuesta. P1, pendiente del fEPSP del primer estímulo; P2, pendiente del fEPSP del segundo estímulo.

ELECTROFISIOLOGÍA *IN VIVO* EN ANIMAL ANESTESIADO

EQUIPAMIENTO

Los registros extracelulares *in vivo* se realizaron fijando el animal a un marco estereotáxico adaptado para ratones, montado sobre una mesa de trabajo neumáticamente aislada dentro de una jaula de Faraday. El registro se realizó en modo diferencial utilizando un sistema de tres electrodos de acero inoxidable, de

manera que uno actuaba como electrodo activo, otro como electrodo de referencia y el tercero como conexión a tierra. La señal proveniente del electrodo activo se amplificaba y filtraba (Differential AC Amplifier Model 1700, A-M Systems) pasando, además, a través de una unidad HumBug para eliminar el ruido eléctrico de 50 Hz. Finalmente la señal se digitalizaba con un sistema de adquisición de datos (PowerLab 4/25T, ADInstruments) conectado a un ordenador personal donde se visualizaba en tiempo real mediante el software LabChart 6 (ADInstruments) (Fig. 12).

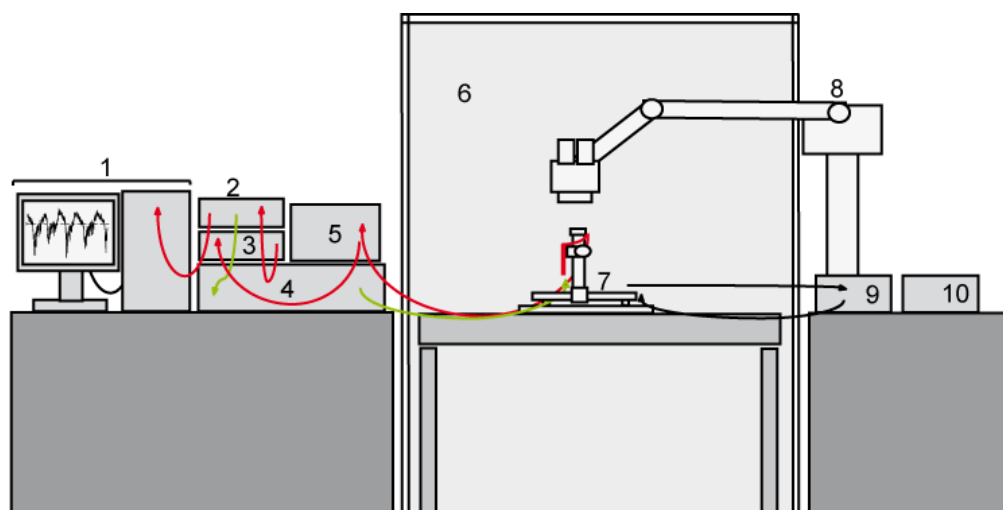


Figura 12. Esquema del sistema para el registro de actividad rítmica *in vivo* en animales anestesiados. 1, Ordenador personal; 2, sistema de adquisición; 3, unidad HumBug; 4, estimulador; 5, amplificador; 6, caja de Faraday; 7, marco estereotáxico; 8, lupa de cirugía; 9, sistema de calefacción; 10, taladro eléctrico.

CIRUGÍA

Los animales se anestesiaron con uretano (1,8g/Kg, i.p.). Tras comprobar la falta de reflejo ocular y de retirada al dolor, se introdujo un termómetro rectal y se colocó al animal sobre una manta térmica para mantener su temperatura corporal de $36.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se situó al animal en el marco estereotáxico para inmovilizar

la cabeza. Se expuso el cráneo mediante una incisión longitudinal en la línea media, se eliminó el periostio de la zona expuesta y se marcaron los puntos de acceso al cerebro. Con un taladro eléctrico (Volvere Vmax, NSK Nakanishi Inc., Japan) se trepanó un orificio para posicionar el electrodo activo, mientras que los restantes se realizaron con una broca manual de mayor diámetro.

En primer lugar se situaron los electrodos menos sensibles al movimiento, el de referencia en las coordenadas (respecto a bregma, en mm): -2 anteroposterior (AP), 1 mediolateral (ML), 0 dorsoventral (DV) (Paxinos y Franklin, 2001); y el de tierra, fijado al hueso occipital. A estos dos electrodos se les dio una forma espiral con el objeto de aumentar la superficie de contacto, y se fijaron con cemento dental (polialqueonato de vidrio, Meron, VOCO GmbH, Alemania). El electrodo activo se introdujo lentamente en el tejido cerebral hasta alcanzar su posición definitiva en el *stratum radiatum* de CA1 (coordenadas: -2 AP, 1,4 ML, 1-1,2 DV) (Paxinos y Franklin, 2001), monitorizando el registro continuamente hasta obtener la mejor relación señal/ruido. Una vez posicionado se procedió a realizar una prueba pinzando la cola del animal, comprobándose la aparición de un breve periodo de actividad sincronizada (Fig.13).

Por último, se implantaron dos electrodos de estimulación de Ni-Cromo intradérmicos en las vibrisas contralaterales al hemisferio de registro para provocar una actividad rítmica en el hipocampo. Los electrodos se conectaron a un estimulador (Isolated Pulse Stimulator Model 2100, A-M Systems) comandado manualmente. La preparación se dejó estabilizar al menos una hora antes de iniciar los registros.

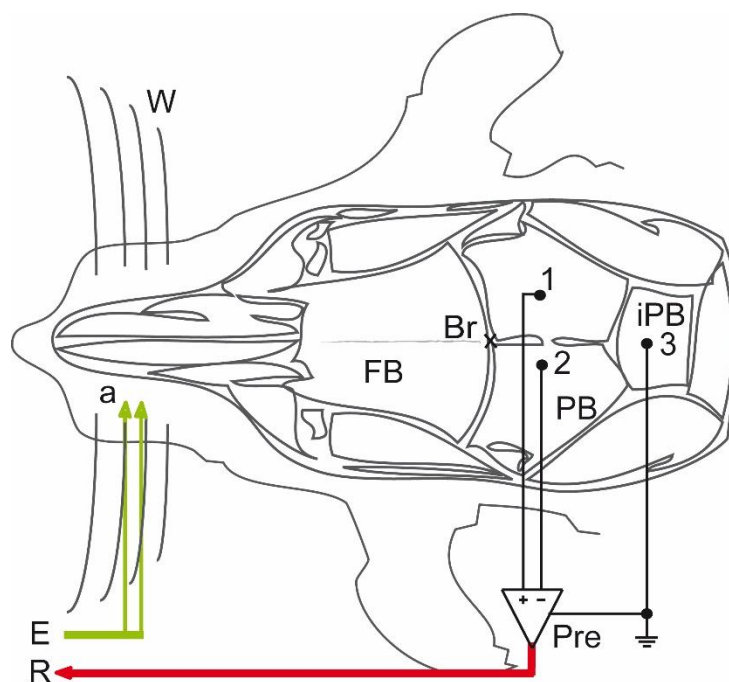


Figura 13. Registros extracelulares *in vivo* en animales anestesiados. Vista dorsal de la disposición de los electrodos de registro (R) activo (1), indiferente (2) y de tierra (3), situados en los huesos parietal (PB) e intraparietal (iPB), y conectados al preamplificador (Pre). También se muestra la situación aproximada (a) de los electrodos de estímulo (E), implantados bajo la piel de las vibrisas (W). Br, *bregma*; FB, hueso frontal.

REGISTRO DE LA ACTIVIDAD RÍTMICA DEL HIPOCAMPO

La actividad bioeléctrica de campo fue amplificada y posteriormente filtrada entre los 0,1 Hz y 1000 Hz, adquiriéndose a una frecuencia de muestreo de 100 K/s. Tras estabilizarse el sistema se realizaron registros del estado basal del animal anestesiado durante un tiempo no menor de 30 minutos, para obtener un patrón claro de la actividad en reposo. Posteriormente se efectuaron los registros de estimulación control en los que, tras un minuto de registro, se aplicaba un protocolo de estimulación consistente en un tren de 10 Hz, a 10 V, durante 10 segundos. El registro se mantuvo durante y después del estímulo, comprobando la aparición de los artefactos y la respuesta provocada en CA1 durante un periodo variable entre uno y dos minutos (Fig. 14).

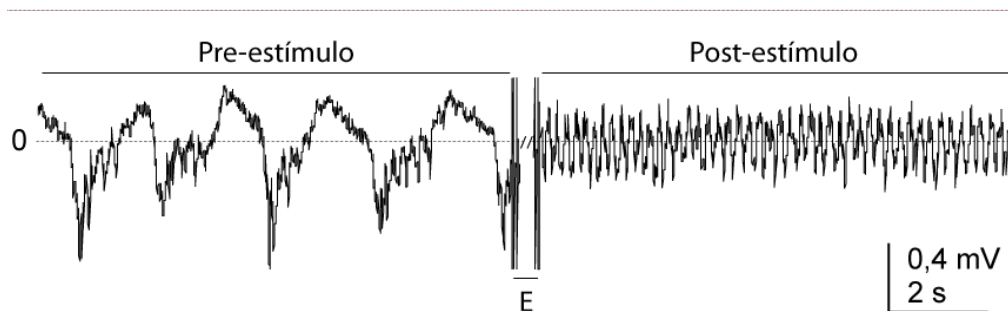


Figura 14. Ejemplo de un registro representativo de la actividad rítmica del hipocampo en un animal anestesiado. Se muestra la actividad previa (Pre-estímulo), en la que predominan ondas lentas de gran amplitud, y posterior (Post-estímulo) a la estimulación eléctrica de las vibrisas (E, no mostrado en su totalidad), que provoca una respuesta sincronizada en el rango de frecuencias entre 4-6 Hz.

El protocolo se aplicó hasta un máximo de cuatro veces en función de la respuesta rítmica de cada animal, dejando un periodo de reposo entre ellos de al menos 10 minutos, considerándose como situación control. Tras esto, se inyectó cafeína (10 mg/kg, i.p.) y transcurridos 5 minutos se aplicó el mismo protocolo de estimulación dentro de la primera hora post-inyección, considerándose como situación experimental.

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD RÍTMICA DEL HIPOCAMPO

La actividad rítmica del hipocampo fue analizada empleando la transformada rápida de Fourier (FFTs). En este tipo de estudio las señales originales, en el dominio del tiempo, son transformadas a sus correspondientes espectros de densidad energética en el dominio de la frecuencia. En nuestro caso se empleó una ventana tipo Hamming con un grado de solapamiento del 50% desde 0,38Hz hasta 99,4Hz y una resolución espectral de 0,38Hz. De esta manera se obtuvo la densidad absoluta de energía para cada frecuencia, que varía ampliamente por depender de la calidad de señal registrada en cada animal. Para reducir esta variación se consideró el

sumatorio de energía de 0 a 100Hz como el 100% y se normalizó la energía de cada frecuencia frente a este total. De esta manera, los datos fueron expresados como el porcentaje del total de energía normalizada (%NTP, del inglés *% of normalized total power*) (Fig. 15).

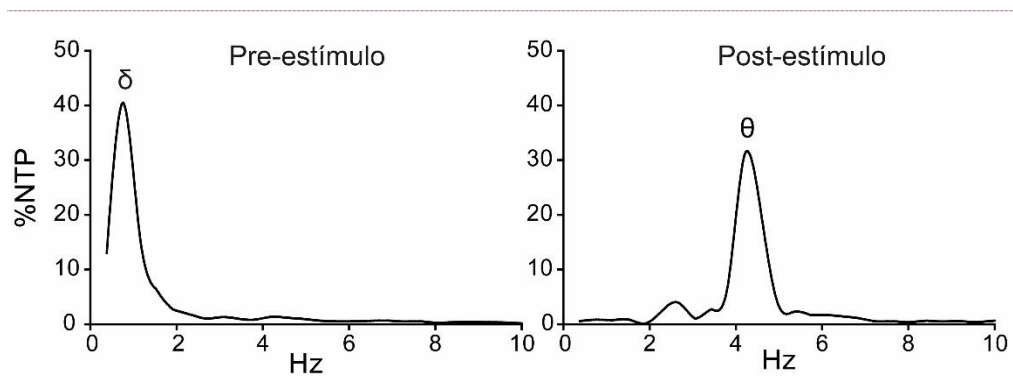


Figura 15. Representación de la densidad de energía normalizada. Se muestran dos espectros de frecuencia obtenidos tras el tratamiento de datos explicado en el texto principal (sólo entre 0 y 10 Hz, en este caso). Los valores de densidad de energía relativizados en función del total (%NTP) se representan frente a sus correspondientes frecuencias (Hz) para establecer los cambios existentes entre el estado basal (Pre-estímulo), donde predomina el ritmo muy lento Delta (δ), y el Post-estímulo, donde el ritmo predominante es el Theta (θ).

Para cada condición experimental se estudió la proporción de energía normalizada de las frecuencias de interés antes (PRE) y después (POST) del estímulo, y las diferencias entre la situación control (CT) y tras la administración de 10mg/Kg de cafeína intraperitoneal (CAF). Se focalizó el análisis en determinar la variación en los rangos de frecuencia Delta (frecuencias menores de 4Hz) y Theta (frecuencias comprendidas entre 4 y 10Hz), por ser predominantes en los animales anestesiados. Para ello, se analizaron segmentos continuos de dos minutos de duración total, que englobaban el minuto previo al inicio del estímulo y el minuto posterior. Estos segmentos fueron divididos en tramos de tres segundos (40 tramos en total) que

fueron sometidos al análisis mediante FFTs empleando el paquete de programas Clampfit 10.2 (MDS Analytical Technologies).

Se obtuvo el sumatorio de energía normalizada en cada tramo de 3 segundos y para cada rango de frecuencia de interés. Se promedió entonces dicho valor de energía durante los 30 segundos inmediatamente previos y posteriores al estímulo, y se compararon para establecer diferencias entre las distintas situaciones experimentales mediante una prueba T-Student para muestras pareadas, fijando el umbral de rechazo de la hipótesis nula en $p=0,05$.

ELECTROFISIOLOGÍA *IN VIVO* EN ANIMAL DESPIERTO

CIRUGÍA

Los animales fueron anestesiados con tribromoetanol (0,2 mg/kg, i.p.) y colocados en un marco esterotáxico, suplementando la dosis del anestésico en caso necesario. Tras exponer el cráneo y limpiar el periostio se trepanaron los orificios para la colocación de los electrodos, empleando las mismas coordenadas ya especificadas. Los electrodos y su pedestal de conexión fueron fijados al cráneo mediante tornillos de anclaje y cemento dental. Una vez suturada la piel, los animales eran devueltos a sus jaulas para su recuperación durante siete días.

REGISTROS DE ACTIVIDAD RÍTMICA

Tras el período de recuperación, los animales fueron trasladados a un recinto circular (21 cm de diámetro) en el que podían moverse libremente, dentro de una jaula de Faraday para minimizar las interferencias eléctricas. El pedestal con los electrodos se conectó a un amplificador diferencial a través de un conmutador tipo

interlock para evitar que el cable de registro se enrollase sobre sí mismo con el movimiento del animal. La señal amplificada fue filtrada entre 0,1 y 500 Hz y digitalizada a una frecuencia de muestreo de 100 K/s. Se llevaron a cabo registros en tres situaciones experimentales: el estado basal (BAS), previo a cualquier tipo de tratamiento; el tratamiento con cafeína (CAF), entre cinco minutos y una hora tras la inyección de una dosis a 10 mg/kg intraperitoneal; y el tratamiento con cafeína y ANA-12 (un antagonista específico del receptor TrkB) a una dosis de 2 mg/kg por vía intraperitoneal (CAF+ANA). En cada situación experimental el protocolo a seguir fue el mismo: se introdujo al animal en el recinto circular de registro y un minuto después se comenzaba el registro de la actividad cerebral durante cuatro minutos para, posteriormente, ser devueltos a sus jaulas.

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD RITMICA

Al igual que en los registros realizados en animales anestesiados, se estudió la variación del porcentaje de densidad de energía, correspondiente a varios tramos de frecuencias de interés, entre los distintos grupos experimentales a lo largo del tiempo, con particular énfasis en el rango de frecuencias Theta (4 a 10 Hz). Los registros se segmentaron en 80 tramos de 3 segundos cada uno y fueron sometidos al análisis por FFTs con el programa Clampfit 10.2 de forma similar a la descrita anteriormente. De esta manera se evaluó la variación del espectro de frecuencia a lo largo del tiempo, obteniéndose el valor promedio de todo el registro como valor de referencia, que nos permitió comparar las distintas situaciones experimentales (Fig. 16). Las posibles diferencias entre grupos fueron contrastadas mediante test de T-Student de dos colas suponiendo varianzas desiguales, con un valor de rechazo de la hipótesis nula fijado en $p=0,05$.

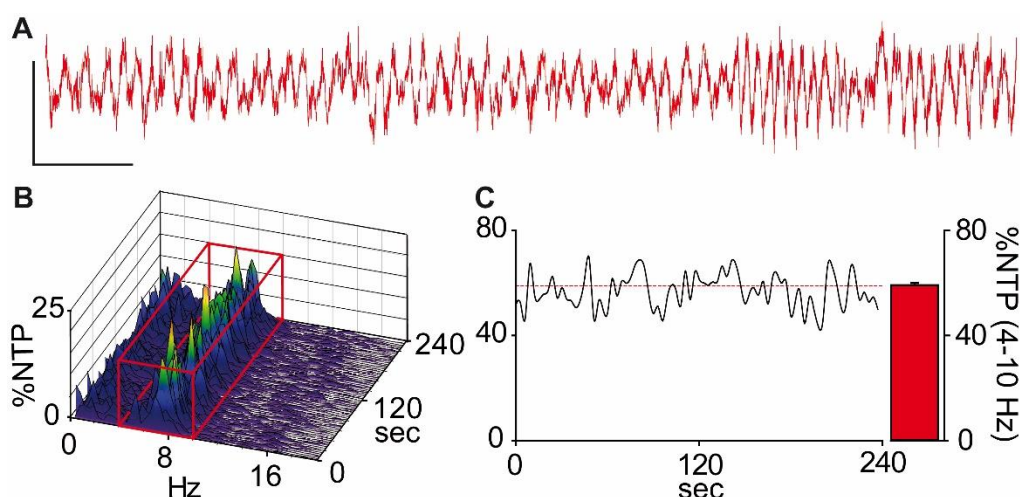


Figura 16. Registro extracelular y análisis de la variación de energía a lo largo del tiempo con implantes crónicos. **A)** Ejemplo de trazo en bruto de la señal de campo registrada en el *stratum radiatum* de CA1 de animales despiertos (barra vertical: 0,1mV; barra horizontal: 1s). **B)** Representación tridimensional del análisis de Fourier, mostrando el curso temporal de la densidad de energía relativa (%NTP), donde se ha remarcado el espacio correspondiente al rango de frecuencias entre 4 y 10 Hz. **C)** De dicho rango se obtiene el sumatorio de densidad de energía para cada tramo de 3 segundos y se representa frente al tiempo (línea negra continua), de modo que puede obtenerse el promedio de %NTP durante los cuatro minutos del experimento (línea punteada y barra).

CUANTIFICACIÓN DE BDNF

OBTENCIÓN DE RODAJAS DE HIPOCAMPO

Las rodajas de hipocampo se obtuvieron mediante el método descrito previamente para los registros electrofisiológicos *in vitro*, con la diferencia que la estructura hipocampal fue diseccionada del resto de tejido cerebral. Previo a los experimentos, las rodajas se estabilizaron al menos durante una hora a temperatura ambiente (20 – 22 °C).

CONDICIONES EXPERIMENTALES DE INCUBACIÓN PARA ELISA

Las rodajas de hipocampo fueron transferidas a cubetas con ACSF mantenido a 35°C, continuamente burbujeado con carbógeno. Para cada condición experimental

se utilizaron tres rodajas de hipocampo expuestas a distintos medios de incubación durante 5 minutos (Fig. 17). El ACSF inicial era sustituido rápidamente por ACSF con los distintos tratamientos, de manera que las rodajas estuvieran el menor tiempo posible sin medio. Las diferentes condiciones experimentales consistieron en: incubación en ACSF control (CT); incubación en ACSF con cafeína 500 μ M (CAF); incubación en ACSF con cafeína 500 μ M y tetrodotoxina 1 μ M (+TTX) e incubación en ACSF con cafeína 500 μ M y rianodina 20 μ M (+RYAN). En todos los casos, se añadieron inhibidores de proteasas para evitar la degradación del péptido: Aprotinina (20 μ g/ml), Leupeptina (20 μ g/ml) y PMFS (2 mM).

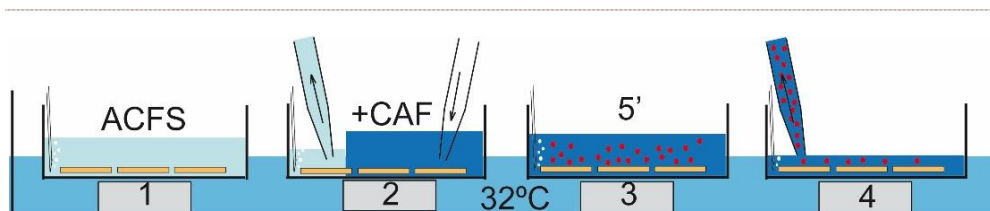


Figura 17. Protocolo de incubación de rodajas de cerebro para la cuantificación de BDNF mediante ELISA. 1) Las rodajas de cerebro se situaron en cubetas conteniendo ACSF a 32°C y burbujeado continuamente. 2) El cambio de medio se realizaba de manera rápida, agregando a la cubeta el ACSF con los inhibidores de proteasas, fosfatasa y los distintos tratamientos experimentales (cafeína, CAF, en el diagrama). 3) La incubación se prolongó cinco minutos, tiempo en que el BDNF (puntos rojos) era secretado al medio. 4) Transcurrido el tiempo de incubación se recogía el sobrenadante y se transfería a las placas de ELISA, o conservaba a 4°C.

Se prepararon las muestras estándar de BDNF proporcionadas por el kit de detección (*Mouse BDNF ELISA Kit*, Biosensis) y, tras la incubación, se obtuvo el ACSF para transferirlo a las placas de ELISA o para conservarlo a 4°C hasta que se requiriera. Una vez transferidas las muestras, se añadieron 62,5 μ g de BDNF (proporcionado por el kit) a todos los pocillos experimentales para asegurar una lectura de BDNF dentro de la recta de calibración estándar. La lectura se realizó en un lector de placas a 415 nm (VICTOR3, Perkin Elmer).

CONDICIONES EXPERIMENTALES DE INCUBACIÓN PARA ELISA *IN SITU*

Las rodajas de cerebro también fueron diseccionadas para trabajar sólo con el tejido hipocampal. La incubación se realizó en los propios pocillos del kit de detección de ELISA, de manera que una proporción del BDNF liberado durante el experimento interaccionase con el anticuerpo primario ya presente. Por cada pocillo se incubaron dos hipocampos, durante 5 minutos, manteniendo un burbujeo suave y constante. Las condiciones de incubación fueron las mismas que las de ELISA clásico, salvo que no se hizo uso de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Tras los cinco minutos se retiraron con cuidado los hipocampos de los pocillos, dejando el medio de incubación en agitación y a 4°C durante toda la noche.

CUANTIFICACIÓN

La cuantificación de BDNF liberado al medio durante las incubaciones se llevó a cabo con el kit de ELISA mencionado. El protocolo seguido fue el indicado por el fabricante, con ligeras modificaciones: Se incubaron 100 µl de muestra por pocillo, durante toda la noche, a 4°C y en agitación. Al día siguiente se lavó 5 veces con TBST (del inglés *Tris-buffered saline and tween 20*) y se incubaron 100 µl del anticuerpo secundario (diluido 1:100) por pocillo durante 3 horas, a temperatura ambiente y en agitación. Tras esta incubación se volvió a lavar 5 veces con TBST y se incubaron 100 µl del complejo Avidina-Biotina (ABC) diluido 1:100, durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. Para revelar el ELISA se lavó 5 veces, 2 minutos por lavado, con TBST y se añadieron 90 µl de TMB a temperatura ambiente. Se esperó entre 5 y 10 minutos la aparición de color y entonces se detuvo la reacción con 100 µl de solución STOP fría. Inmediatamente se leyó la

absorbancia a 415 nm (VICTOR3, Perkin Elmer) para después calcular las concentraciones de BDNF detectado. Los valores de absorbancia se interpretaron en función de las rectas de calibración correspondientes a cada experimento, se expresaron como concentración absoluta o relativa de BDNF, según se especifique. Los valores promedios para cada situación experimental se compararon dos a dos mediante test T-Student de dos colas, suponiendo varianzas desiguales, situando el umbral de rechazo de la hipótesis nula en 0,05.

Nombre	Compañía*	Uso**	Solvente	Peso Molecular
2,2,2-Tribromoetanol 97%	SIGMA	Anestésico	DMSO	282.76
ANA-12	SIGMA	Antagonista TrkB	DMSO	407.49
Aprotinina	SIGMA	Inhibidor de proteasas	DMSO	6511.44
BDNF recombinante humano	PEProtech	BDNF estándar	PBS	27.0 kDa
Bicarbonato de sodio	SIGMA	ACSF	H ₂ O	84.01
Cafeína	SIGMA	Agonista A ₁ y A _{2A}	PBS	194.19
Cloruro de potasio	SIGMA	ACSF	H ₂ O	74.55
Cloruro sódico	SIGMA	ACSF	H ₂ O	58.44
D-AP5, o AP5	TOCRIS	Antagonista NMDA	ACSF	197.13
D-(+)-Glucosa	SIGMA	ACSF	H ₂ O	180.16
Dimetilsulfóxido, DMSO	PANREAC	Solvente	-	78.13
DPCPX	TOCRIS	Agonista A ₁	DMSO	304.39
Fosfato de potasio monobásico	SIGMA	ACSF	H ₂ O	136.09
Leupeptina	SIGMA	Inhibidor de proteasas	DMSO	463.01
LY294002	TOCRIS	Inhibidor de PI3K	DMSO	343.81
Picrotoxina	SIGMA	Antagonista de GABA _A	ACSF	602.58
PMSF	SIGMA	Inhibidor de Proteasas	DMSO	174.19
Ryanodina	TOCRIS	Agonista de canales de calcio reticulares	ACSF	493.55
SB203508	TOCRIS	Inhibidor de MAPK	DMSO	377.44
Sulfato de magnesio	SIGMA	ACSF	H ₂ O	120.37
TTX	TOCRIS	Bloqueante de canales de sodio	ACSF	319.27
U0126	TOCRIS	Inhibidor de ERK	DMSO	380.48
U73122	TOCRIS	Inhibidor de PLC γ	DMSO	464.65
Uretano	SIGMA	Anestésico	DMSO	89.09
Wortmanina	TOCRIS	Inhibidor de PI3K	DMSO	428.44

Tabla 1: Fármacos y Reactivos. *SIGMA: Sigma-Aldrich. St. Louis, EE.UU.; TOCRIS: Tocris Bioscience. Bristol, Reino Unido; CALBIOCHEM: Merk-Millipore. Darmstadt, Alemania; PANREAC: PanReac AppliChem. Barcelona, España. **: ACSF: el reactivo es un componente de la Fluido Cerebroespinal artificial.



“Science is more than a body of knowledge. It is a way of thinking; a way of skeptically interrogating the universe with a fine understanding of human fallibility”

La ciencia es más que un conjunto de conocimientos. Es una forma de pensamiento, una manera de interrogar escépticamente al universo, con una fina comprensión de la falibilidad humana.

Carl Sagan, astrónomo, escritor, y comunicador científico.

RESULTADOS

LA CAFÉINA INDUCE LTP EN LAS SINAPSIS DE CA3-CA1

Distintas evidencias experimentales previas indican que la cafeína es un compuesto capaz de provocar cambios funcionales a nivel sináptico a largo plazo (Martín y Buño, 2003). Para estudiar los mecanismos celulares y moleculares implicados, en nuestro trabajo experimental utilizamos concentraciones de cafeína de 100 μM , que se considera cercana a la dosis alcanzada por un consumo moderado en humanos (Fredholm *et al.*, 1999).

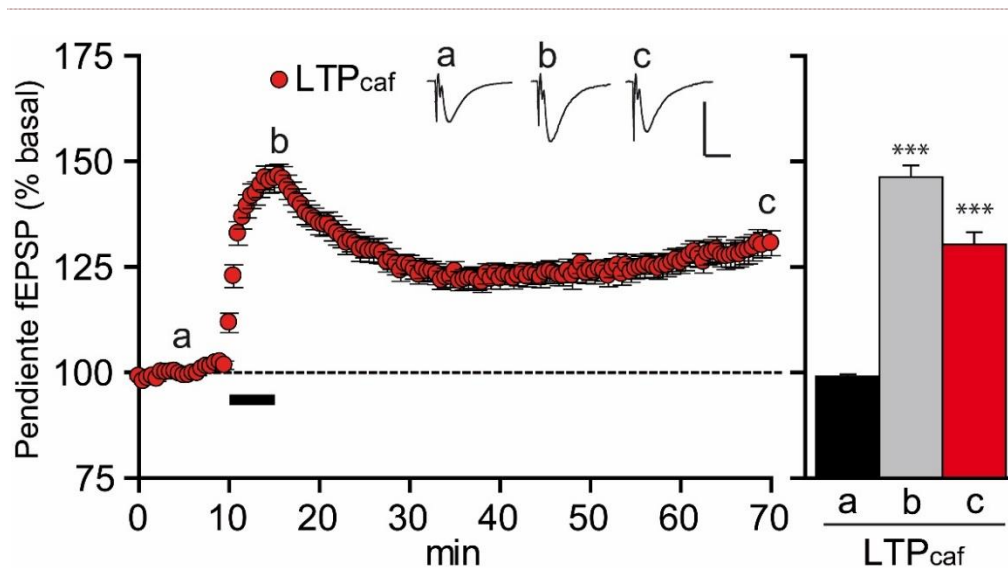


Figura 18. LTP mediada por cafeína en sinapsis de CA1 *in vitro*. A la izquierda se muestra el curso temporal de la pendiente de los fEPSPs en los ensayos *in vitro* con cafeína. Tras diez minutos de registro estable (a) se aplicó cafeína 100 μM (barra negra) a las rodajas de cerebro. El efecto inmediato fue el incremento de la transmisión sináptica excitadora (b, $146.5 \pm 2.7\%$, $n=40$), seguido de un descenso gradual que se estabiliza a largo plazo (c, $130.56 \pm 2.94\%$, $n=40$). Insertados en el gráfico se muestran trazos representativos de los fEPSPs registrados en las situaciones a, b y c. Barra de calibración vertical: 1mV; horizontal: 10ms. A la derecha se muestra el resumen de las etapas del fenómeno y las diferencias estadísticas correspondientes (***: $p < 0.001$ vs. Basal).

La aplicación de cafeína 100 μ M (5 min) induce un rápido incremento de la pendiente de los fEPSPs que alcanza su máximo valor a los 5 minutos tras iniciar la perfusión ($146.5 \pm 2.7\%$, Fig. 18). Los niveles de potenciación se mantuvieron estables durante el transcurso del experimento alcanzando valores de $130,56 \pm 2,94\%$ a los 60 minutos de registro (Fig. 18; $p < 0.001$; $n = 40$). Dicho aumento de la eficacia sináptica fue muy consistente, observándose en el 64.6% de las rodajas analizadas (Fig. 19). Estos resultados indican que la cafeína, a concentraciones cercanas a las de consumo humano, produce un incremento en la eficacia sináptica a largo plazo en las conexiones CA3-CA1 (LTP_{CAF}).

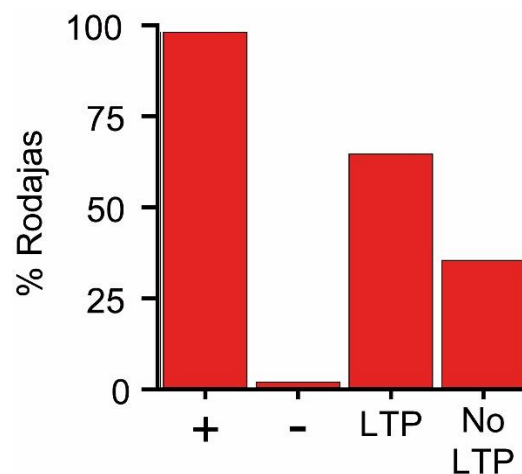


Figura 19. Eficacia en la inducción de LTP_{CAF} . Resumen del total de rodajas de cerebro (%Rodajas) que respondieron (+) a la aplicación de cafeína (incrementaron la pendiente de fEPSPs), frente a las que no (-); así como el porcentaje de las positivas que mostraron LTP_{CAF} (LTP), y las que no (No LTP). El fenómeno se observó en el 64,60% del total de rodajas que respondieron a la cafeína, el cual fue del 98% del total de rodajas estudiadas.

Con el objeto de establecer un paralelismo con otras formas clásicas de inducir LTP (Bliss y Collingridge, 1993), se realizaron una serie de experimentos adicionales estimulando eléctricamente las rodajas mediante un protocolo clásico de estimulación a alta frecuencia (HFS). Este tipo de potenciación genera un

incremento de los fEPSPs estadísticamente similar a la LTP_{CAF} a los 60 minutos de su inducción (Fig. 20, $HFS=137,42 \pm 4,99\%$, $n=12$ vs. $LTP_{CAF}=130,56 \pm 2,94\%$, $n=40$; $p=0,2521$). Estos resultados demuestran que la cafeína es capaz de generar una potenciación sináptica a largo plazo de similar magnitud a la generada por un protocolo clásico de inducción como es la HFS.

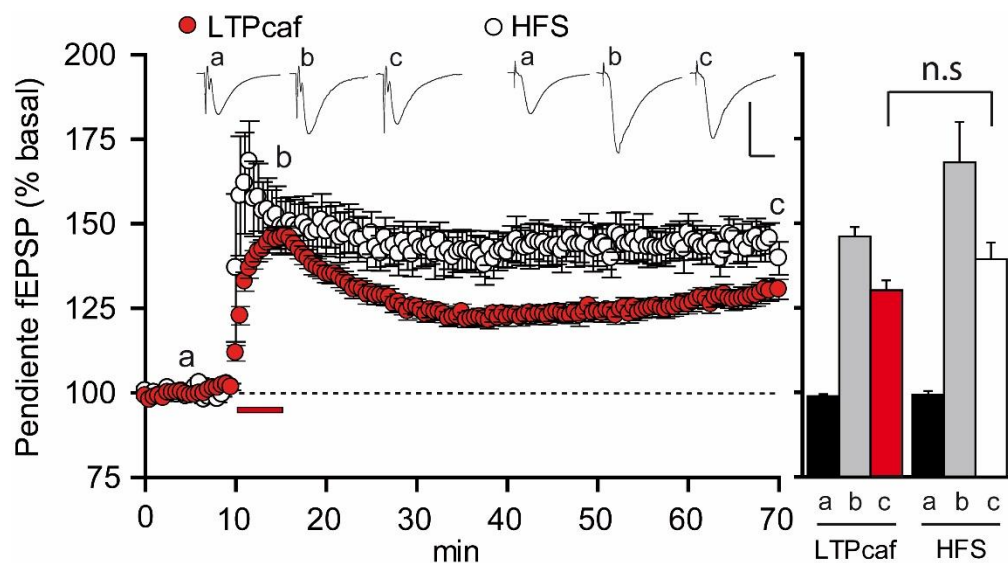


Figura 20. La magnitud de la LTP_{CAF} es comparable a la obtenida mediante HFS. A la izquierda se muestran los cursos temporales para la LTP_{CAF} (círculos rojos) y la LTP inducida por HFS (círculos blancos). Los valores de potenciación a largo plazo (c) fueron similares en ambos casos ($HFS=137,42 \pm 4,99\%$, $n=12$ vs. $LTP_{CAF}=130,56 \pm 2,94\%$, $n=40$; $p=0,2521$). Insertos en el gráfico se muestran trazos representativos de los fEPSPs registrados en el estado basal (a), de inducción (b) y tras 60 minutos (c) para ambos grupos. Barra de calibración vertical: 1mV; horizontal: 10ms. A la derecha se muestran los datos resumidos para resaltar las diferentes etapas del fenómeno y las diferencias estadísticas correspondientes (n.s: $p>0.05$).

LA LTP_{CAF} ES INDEPENDIENTE DE RECEPTORES DE GLUTAMATO TIPO NMDA

Clásicamente, en los fenómenos de potenciación a largo plazo participan mecanismos dependientes de la actividad de receptores ionotrópicos de glutamato

tipo NMDA (Malenka *et al.*, 1988; Bliss y Collingridge, 1993). Dado que la cafeína a concentraciones altas produce una LTP independiente de receptores NMDA (Martín y Buño, 2003), se realizaron una serie de experimentos empleando concentraciones de cafeína cercanas al consumo humano para establecer la participación de dicho receptor en la LTP_{CAF}.

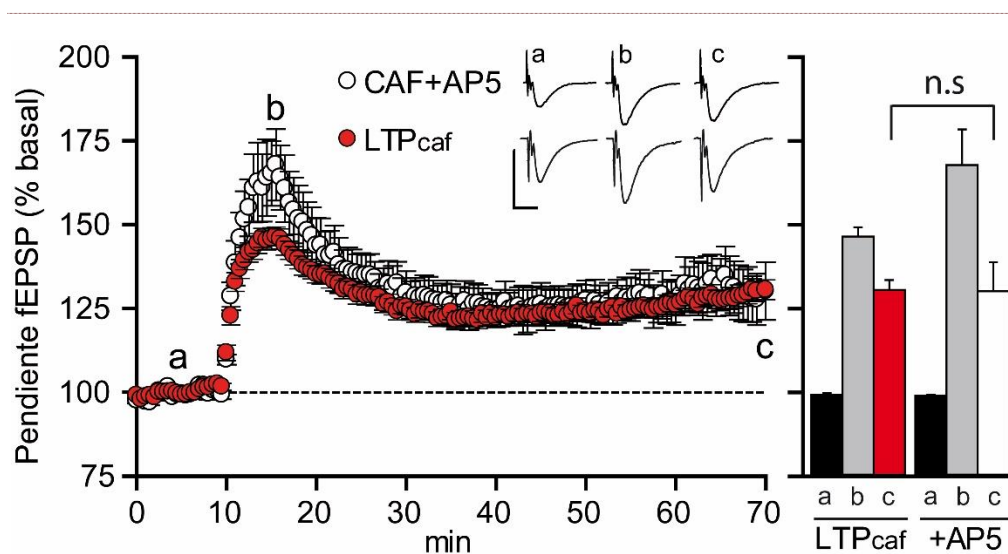


Figura 21. La LTP_{CAF} es independiente de la actividad de receptores tipo NMDA. A la izquierda se muestran los cursos temporales para la LTP_{CAF} en presencia (círculos blancos, CAF+AP5) y ausencia (círculos rojos, LTP_{CAF}) de AP5. La potenciación a largo plazo fue similar en ambos casos (LTP_{CAF}=130,56 ± 2,94%, n=40 vs CAF+AP5=130,16 ± 8,63%, n=6; p>0,05). Insertados en el gráfico se muestran trazos representativos de los fEPSPs registrados en el estado basal (a), tras la inducción (b) y tras 60 minutos (c) para ambos grupos. Barra de calibración vertical: 1mV; horizontal: 10ms. A la derecha se muestran los datos resumidos para resaltar las diferentes etapas del fenómeno y las diferencias estadísticas correspondientes (n.s: p>0.05).

Los resultados obtenidos indican que la presencia del antagonista específico de receptores tipo NMDA, AP5 (50 µM), antes y durante la perfusión con cafeína (100 µM, 5 minutos), no modifica la LTP_{CAF} (Fig. 21, LTP_{CAF}=130,56 ± 2,94%, n=40 vs. CAF+AP5= 130,16 ± 8,63%, n= 6), confirmando que la actividad de los

receptores tipo NMDA no participan en la LTP_{CAF} independientemente de la concentración de cafeína utilizada.

EN LA LTP_{CAF} NO PARTICIPA LA INHIBICIÓN MEDIADA POR RECEPTORES GABAÉRGICOS

Un posible mecanismo a través del cual la cafeína podría modificar a largo plazo la eficacia sináptica es la acción sobre receptores ionotrópicos $GABA_A$ (Fredholm *et al.*, 1999) modificando el tono inhibitor en la sinapsis CA3-CA1. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron los experimentos en presencia del antagonista de $GABA_A$ picrotoxina (PTX, 50 μM) antes y durante la perfusión de cafeína (100 μM , 5 minutos). Bajo estas condiciones no se observaron diferencias en los valores

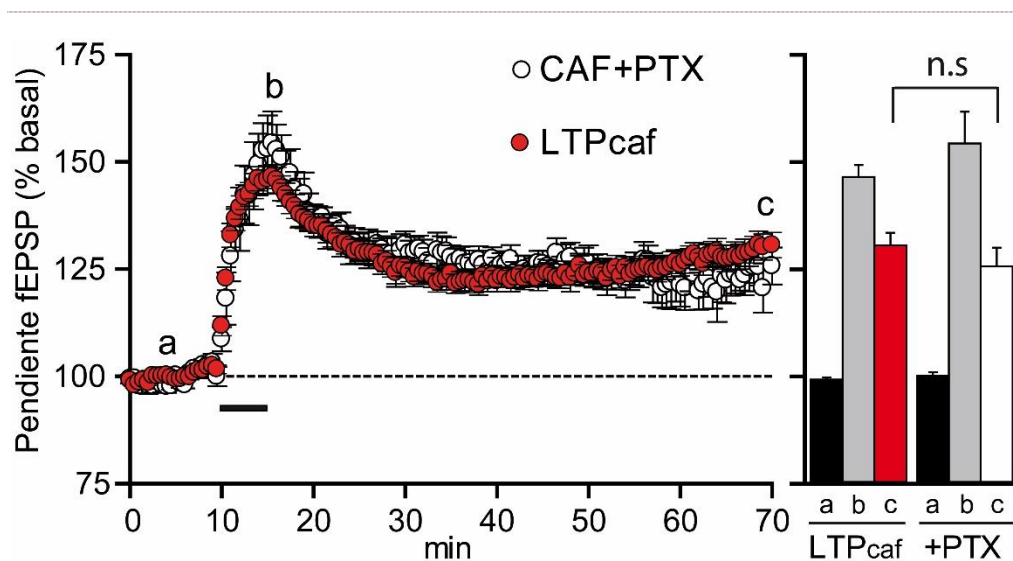


Figura 22. La LTP_{CAF} no se modifica por el bloqueo de receptores $GABA_A$. A la izquierda se muestra el curso temporal de los ensayos de potenciación en presencia de picrotoxina 50 μM (CAF+PTX), donde se observan valores de potenciación similares a los obtenidos en ausencia del antagonista (CAF+PTX=125,70 \pm 4,32%, n=6 vs. LTP_{CAF} =130,56 \pm 2,94% n=40; p=0,3197). A la derecha se muestran los datos resumidos para resaltar las diferentes etapas del fenómeno (a, basal; b, inducción; c, 60 minutos tras aplicación de cafeína) y las diferencias estadísticas correspondientes (n.s: p>0.05).

de potenciación en uno y otro caso (Fig. 22, CAF+PTX=125,70 \pm 4,32%, n=6 vs. LTP_{CAF}=130,56 \pm 2,94% n=40), descartándose la participación de la inhibición mediada por receptores GABA_A en este fenómeno.

EN EL MANTENIMIENTO DE LA LTP_{CAF} PARTICIPAN MECANISMOS DE ORIGEN POSTSINÁPTICOS

Para establecer el origen pre o post sináptico de la LTP_{CAF}, se utilizó el paradigma de la facilitación por pares de pulsos (PPF) que nos permite establecer en forma indirecta si existen cambios en la probabilidad de liberación de neurotransmisor durante la facilitación sináptica (Schulz *et al.*, 1994). Los resultados indican dos hechos a tener en cuenta. En primer lugar, la etapa de inducción de la potenciación mediada por cafeína a dosis moderadas y altas (0,1 - 5 mM) tiene un origen presináptico, como indica la reducción del PPF_{ratio} (Fig. 23A, 0,1 mM: BAS=1.10 \pm 0.10, n=12 vs. CAF=0,71 \pm 0,10; n=12, p<0,05; 0,5 mM: BAS=0.76 \pm 0.02, n=16 vs. CAF=0,49 \pm 0,03; n=16, p<0,001; 5 mM: BAS=0.82 \pm 0.03, n=24 vs. CAF=0,57 \pm 0,02, n=23, p<0,001). En segundo lugar, observamos que durante la fase de mantenimiento de la LTP_{CAF} los valores del PPF_{ratio} son similares a los basales en todos los casos (Fig. 23A, 0,1mM: BAS=1.10 \pm 0.10, n=12 vs. LTP=0,99 \pm 0,12; n=12, p>0,05; 0,5mM: BAS=0.76 \pm 0.02, n=16 vs. LTP=0,81 \pm 0,04; n=16, p>0,05; 5mM: BAS=0.82 \pm 0.03, n=24 vs. LTP=0,75 \pm 0,03; n=23, p>0,05). En esta serie experimental se comprobó que, efectivamente, a largo plazo existía LTP_{CAF}, a las distintas concentraciones utilizadas (Fig. 23B). Estos resultados nos revelan que en la fase de inducción de la LTP_{CAF} participan mecanismos presinápticos mientras que, en la etapa de mantenimiento, están involucrados mecanismos de origen postsináptico.

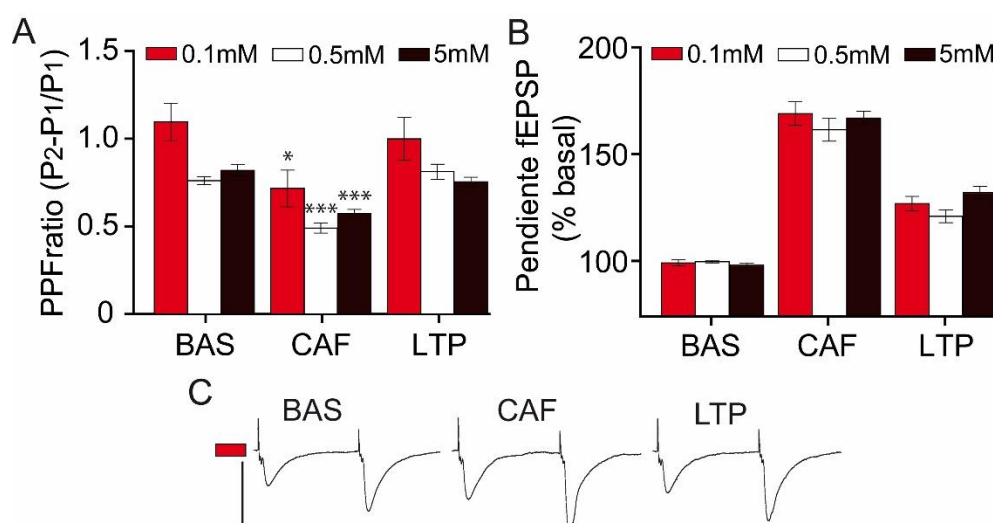


Figura 23. En el mantenimiento de la LTP_{CAF} participan mecanismos de origen postsináptico. **A:** Los experimentos de PPF muestran un descenso significativo en el PPFratio en las etapas de inducción (CAF) con respecto al valor basal (BAS) para todas las concentraciones de cafeína utilizadas (0,1mM: BAS=1.10 ± 0.10, n=12 vs. CAF=0,71 ± 0,10; n=12; 0,5mM: BAS=0.76 ± 0.02, n=16 vs. CAF=0,49 ± 0,03; n=16; 5mM: BAS=0.82 ± 0.03, n=24 vs. CAF=0,57 ± 0,02, n=23). Sin embargo, a largo plazo (LTP) el PPFratio muestra valores similares a los basales (0,1mM: BAS=1.10 ± 0.10, n=12 vs. LTP=0,99 ± 0,12; n=12; 0,5mM: BAS=0.76 ± 0.02, n=16 vs. LTP=0,81 ± 0,04; n=16; 5mM: BAS=0.82 ± 0.03, n=24 vs. LTP=0,75 ± 0,03; n=23). *: p<0,05, ***: p<0,001. **B:** se muestran los valores de potenciación a corto (CAF) y largo plazo (LTP) obtenidos en estos experimentos. **C:** Trazos representativos de la situación experimental con cafeína 100µM a los diferentes tiempos estudiados. Barra de calibración vertical: 2mV; horizontal: 20ms.

LA CAFEÍNA PROMUEVE LA SECRECIÓN DE BDNF EN RODAJAS DE HIPOCAMPO

Se ha demostrado previamente que la cafeína es capaz de promover una secreción masiva de BDNF al medio extracelular por parte de neuronas piramidales en cultivo (Santi *et al.*, 2006) y dado que existen sólidas evidencias que esta neurotrofina interviene en la plasticidad sináptica así como en el fenómeno de LTP (Aicardi *et al.*, 2004; Costenla *et al.*, 2010), postulamos la hipótesis que el BDNF podría estar involucrado en los mecanismos de la LTP_{CAF}. Para demostrarlo, se llevaron a cabo

dos aproximaciones experimentales diferentes: medición de niveles de BDNF mediante técnicas de ELISA y análisis del fenómeno de LTP_{CAF} en registros electrofisiológicos en rodajas, tanto en animales silvestres como en heterocigotos para el BDNF.

Empleando técnicas de ELISA, para cuantificar la concentración de BDNF, pudimos demostrar que la incubación de rodajas de hipocampo en presencia de cafeína 100 μ M produce un aumento de la concentración de BDNF detectable en el medio extracelular (Fig. 24, CAF=175,47 \pm 17,43%, p=0,0002, n=27). Se comprobó, además, que la secreción de BDNF inducida por cafeína es dependiente de la actividad neuronal y de la movilización de calcio desde los reservorios intracelulares sensibles a rianodina ya que fue bloqueada en presencia de tetrodotoxina (Fig. 24, TTX=109,76 \pm 14,73%, p=0,01, n=6) o rianodina (Fig. 24, RYAN=82,51 \pm 10,62%, p=0,0002, n=3), respectivamente, en el medio de incubación.

Estudios complementarios de ELISA, utilizando rodajas de hipocampo de animales heterocigotos para BDNF, mostraron que la secreción de BDNF basal fue menor respecto a la encontrada en los animales homocigotos de la misma camada (Fig. 25, BDNF^{+/+}_{basal}=281,5 \pm 46,4pg/ml, n=13 vs. BDNF^{+/-}_{basal}=89,00 \pm 26,78pg/ml, n=3, p=0,006). Además, no se observó un incremento en la secreción de BDNF inducida por la cafeína en los animales heterocigotos (Fig. 25, BDNF^{+/-}_{basal}=89,00 \pm 26,78pg/ml, n=3 vs. BDNF^{+/-}_{CAF}=128,5 \pm 20,4pg/ml, n=5, p=0,3).

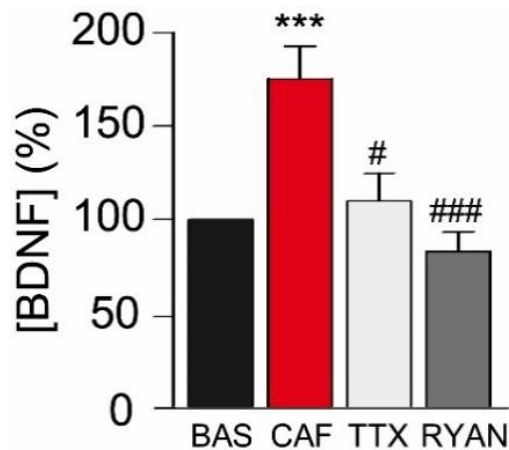


Figura 24. La secreción de BDNF inducida por cafeína depende de la actividad neuronal y de los reservorios de Ca^{2+} intracelular. La cafeína (CAF) incrementa la concentración de BDNF en rodajas de hipocampo con respecto a los valores basales (CAF=175,47 ± 17,43%, n=27, ***: p<0,001 vs BAS). Esta liberación fue significativamente menor en presencia de tetrodotoxina (TTX=109,76 ± 14,73%, n=6, #: p<0,01 vs. CAF) o rianodina (RYAN=82,51 ± 10,62%, n=3, ###: p<0,001 vs CAF) con respecto a los controles de cafeína.

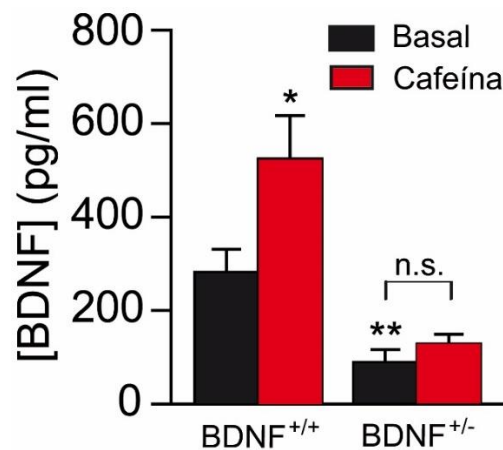


Figura 25. La secreción de BDNF inducida por cafeína es menor en animales heterocigotos. La liberación basal de BDNF (BDNF^{+/+}_{basal}=281,5 ± 46,4pg/ml, n=13) disminuyó significativamente en animales heterocigotos (BDNF^{+/-}_{basal}=89,00 ± 26,78pg/ml, n=3, **: p<0,01). Además, el incremento de liberación producido por la cafeína en los animales homocigotos (BDNF^{+/+}_{CAF}=524,4 ± 92,4pg/ml, n=26, *: p<0,05), no se observa en los animales heterocigotos (BDNF^{+/-}_{CAF}=128,5 ± 20,4pg/ml, n=5, n.s.: p>0,05).

Por otra parte, los registros de los fEPSPs revelan una LTP_{CAF} consistente en ambos genotipos aunque significativamente de menor magnitud en el animal BDNF^{+/-} con respecto al BDNF^{+/+} de la misma camada (Fig. 26, BDNF^{+/-}: 115,86±1,63%, n=8 vs. BDNF^{+/+}: 131,78±5,32%, n=7). Analizados en su conjunto, estos datos indican que la cafeína promueve la secreción de BDNF al medio extracelular a través de mecanismos dependientes de actividad neuronal y de la movilización de calcio intracelular y que esta secreción es necesaria para el mantenimiento de la LTP_{CAF}.

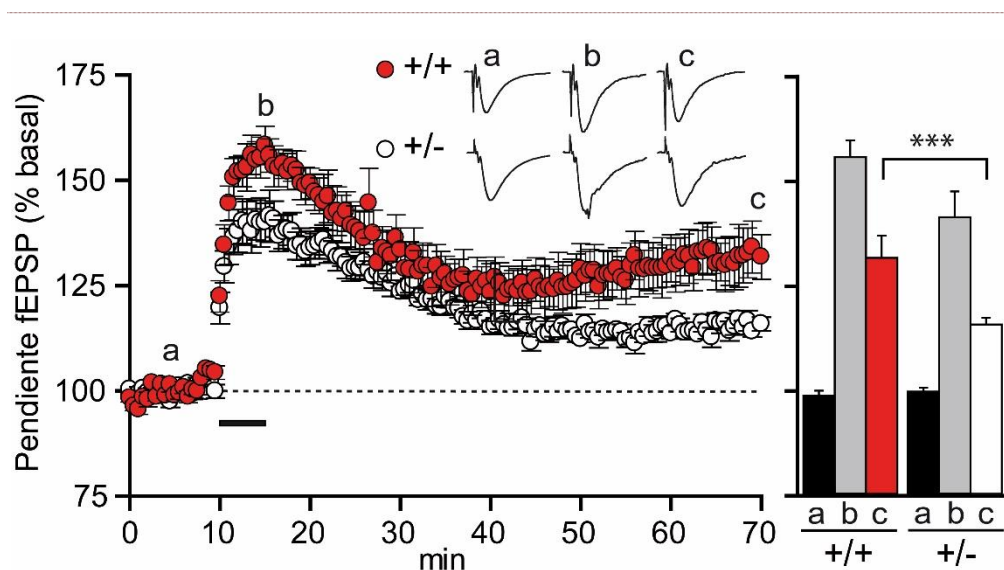


Figura 26. La LTP_{CAF} es significativamente menor en el animal heterocigoto para el BDNF. A la izquierda se muestran los cursos temporales obtenidos tras la perfusión de cafeína en rodajas de cerebro de animales heterocigotos para BDNF (+/-) y en sus compañeros de camada homocigotos (+/+). Insertados en el gráfico se muestran trazos representativos de los fEPSPs registrados en condiciones basales (a), tras la inducción (b) y tras 60 minutos (c) para ambos grupos experimentales. Barra de calibración vertical: 1mV; horizontal: 10ms. A la derecha se observara la significativa disminución de la LTP_{CAF} en los animales heterocigotos (+/-: 115,86 ± 1,63%, n=8 vs. +/+: 131,78 ± 5,32%, n=7, ***: p<0,001).

LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR PI3K ES NECESARIA PARA EL MANTENIMIENTO DE LA LTP_{CAF}

Las principales vías de señalización intracelular activadas a través de los receptores específicos de TrkB son las mediadas por PI3K, PLC γ y MAPK (Costenla *et al.*, 2010). Dado que nuestros datos experimentales indican que el BDNF es liberado durante la LTP_{CAF}, que es necesaria la interacción con su receptor de alta afinidad TrkB (datos del laboratorio, no publicados) (Lao-Peregrín, 2012) (Lao-Peregrín, 2012) (Lao-Peregrín, 2012) y que algunas de las vías de señalización activadas por TrkB están relacionadas con la plasticidad sináptica (Minichiello *et al.*, 2002; Gruart *et al.*, 2007), realizamos una serie de experimentos para determinar las

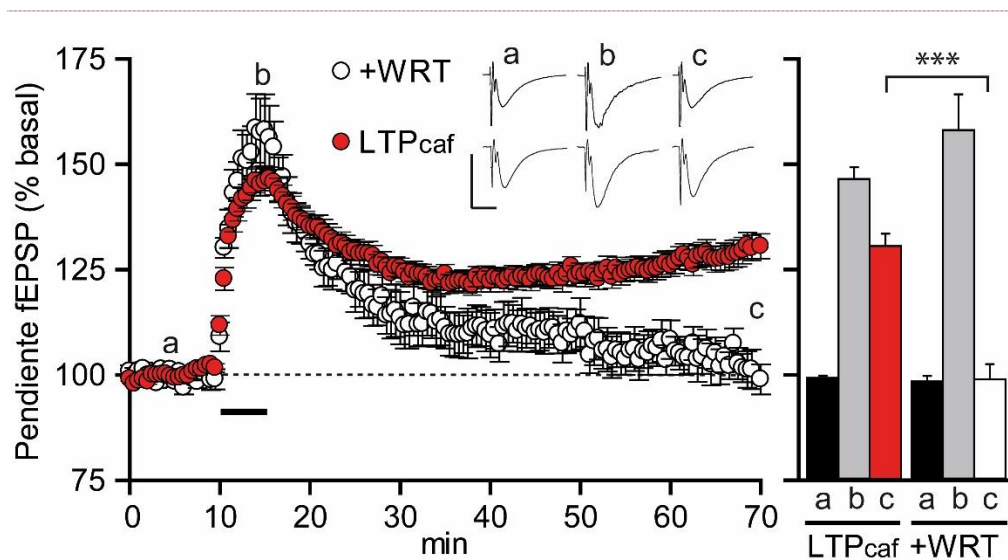


Figura 27. La vía de señalización mediada por PI3K/Akt es necesaria para el mantenimiento de la LTP_{CAF}. A la izquierda se muestra el curso temporal de la LTP_{CAF} en presencia de Wortmanina 1 μ M (círculos blancos, CAF+WRT) lo que impide el mantenimiento de la potenciación sináptica. Insertados en el gráfico se muestran trazos representativos de los fEPSPs registrados en el estado basal (a), tras la inducción (b) y tras 60 minutos (c) para ambos grupos experimentales. Barra de calibración vertical: 1mV; horizontal: 10ms. A la derecha se observa la disminución significativa de la potenciación a largo plazo en los experimentos donde el inhibidor estuvo presente (CAF+WRT=98,95 \pm 3,61%, n=7, ***: p<0,001), retornando a los niveles basales.

posibles vías de señalización intracelular implicadas en la LTP_{CAF}. Para ello, se realizaron registros electrofisiológicos en rodajas de hipocampo en presencia de inhibidores de la PI3K (Wortmanina, WRT, 1μM, Fig. 27), de PLCγ (U73122, 10 μM, Fig. 28) y de p38-MAPK y MEK (SB203580 y U0126, 20 μM, respectivamente, Fig. 28).

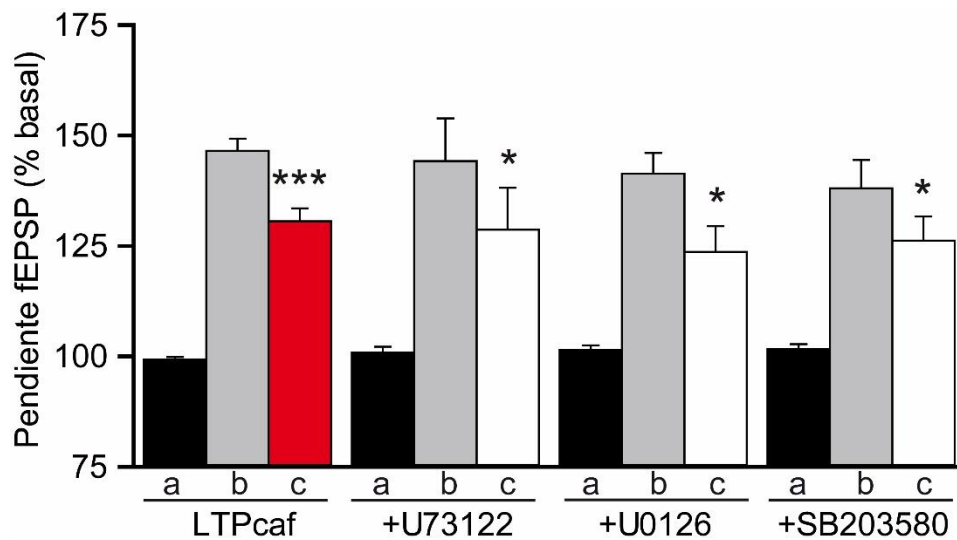


Figura 28. El mantenimiento de la LTP_{CAF} no depende de la actividad de PLCγ, MEK o MAPK. El incremento de pendiente de los fEPSPs a los 60 minutos en presencia de los inhibidores de PLCγ (+U73122, c: 128,66 ± 9,46%, n=7), MEK (+U0126, c: 123,62 ± 5,86%, n=7) o MAPK (+SB203580, c: 126,15 ± 5,49%, n=7) fue similar al obtenido en los experimentos sin inhibidores (LTP_{CAF}, c: 130,56 ± 2,94, n=40, ns: p>0,05 en todos los casos). En todos los grupos se observó el mismo curso temporal que en LTP_{CAF} como demuestran los valores obtenidos en las situaciones basal (a), de inducción a los 5 minutos (b) y a los 60 minutos (c). *: p<0,05, ***: p<0,001 respecto al estado basal del propio grupo.

Los resultados obtenidos indican que la activación de PI3K es necesaria para el mantenimiento de la LTP_{CAF} ya que su inhibición antes y durante la inducción del fenómeno conlleva al retorno de la pendiente de fEPSPs a los niveles basales (Fig. 27, CAF+WRT=98,95 ± 3,61%, n=7). Por otro lado, los datos muestran que la inhibición de PLCγ (+U73122=128,66 ± 9,46%, n=7), p38-MAPK

(+SB203580=126,15 \pm 5,49%, n=7) o MEK (+U0126=123,62 \pm 5,86%, n=7) no afecta al mantenimiento de la LTP_{CAF}, ya que los niveles de potenciación a largo plazo obtenidos en todos los casos no se diferenciaron de los valores control (Fig. 28).

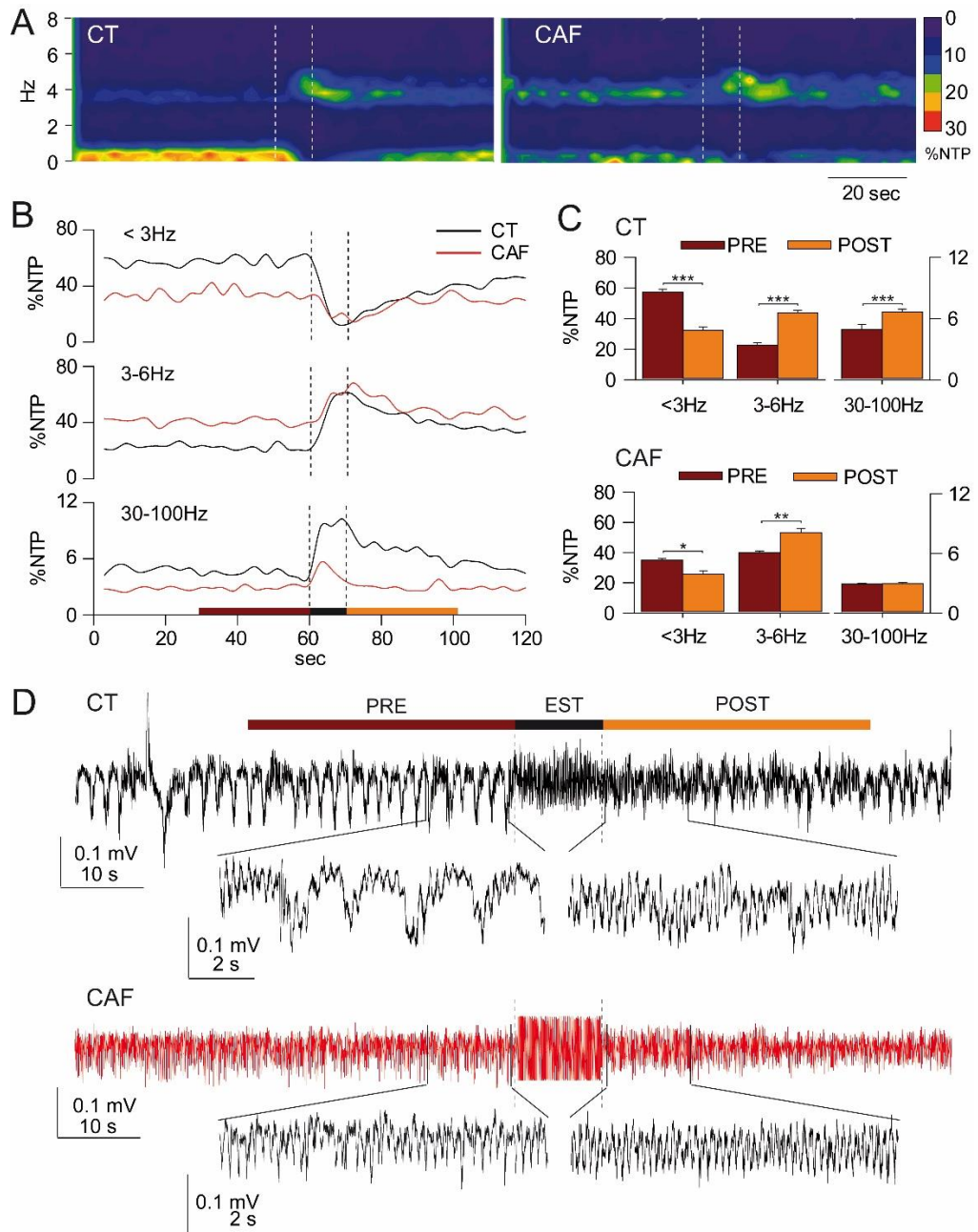
LA CAFEÍNA INCREMENTA LA ACTIVIDAD RÍTMICA PROVOCADA POR ESTÍMULOS SOMÁTICOS

Los resultados obtenidos en rodajas de hipocampo demuestran que la cafeína, a dosis cercanas a la de consumo habitual en humanos, es capaz de modificar la eficacia sináptica a largo plazo en la sinapsis de CA3-CA1, lo que nos proporciona una base celular y molecular de su posible efecto en la memoria y aprendizaje. Por lo tanto, nuestro siguiente paso fue estudiar su efecto en condiciones experimentales fisiológicas en un animal intacto tanto anestesiado como despierto. La estructura hipocámpica está involucrada en los fenómenos cognitivos de aprendizaje y memoria espacial (Kandel, 2001; Phelps, 2004; Gruart *et al.*, 2015) que se correlacionan electrofisiológicamente con actividades rítmicas denominadas Theta y Gamma (Buzsaki, 2002; Lisman y Jensen, 2013).

Como una primera aproximación al efecto que la cafeína podría tener sobre la dinámica de dicha actividad, se utilizaron animales anestesiados con el objeto de aplicar, de manera controlada, un estímulo somático relacionado con la exploración antes (CT) y después del tratamiento con cafeína (CAF). Los resultados de los test pre/post-estímulo (PRE/POST) en dicho modelo (Fig.29) muestran que en el grupo CT la estimulación generó un incremento del porcentaje de energía total normalizada (%NTP) en el rango de frecuencias Theta (θ) lentas, en torno a los 3 -

6 Hz ($CT\theta_{pre}=21.66 \pm 0.65\%$ vs. $CT\theta_{post}=46.12 \pm 2.20\%$, $p<0.001$, $n=10$), disminuyendo el %NTP del ritmo Delta (δ) de menos de 3Hz ($CT\delta_{pre}=58.67 \pm 1.01\%$ vs. $CT\delta_{post}=29.59 \pm 2.51\%$, $p<0.001$, $n=10$). Además, se observó un incremento significativo del %NTP de las frecuencias Gamma (γ) de 30-100Hz ($CT\gamma_{pre}=4.48 \pm 0.12\%$ vs. $CT\gamma_{post}=6.96 \pm 0.31\%$, $p<0.001$, $n=10$).

➔ **Figura 29. La cafeína incrementa la actividad Theta en el hipocampo de animales anestesiados.** A) Espectros de energía promedios de los grupos CT ($n=12$) y CAF ($n=8$). Se observa el incremento de densidad de energía normalizada (%NTP) sobre la banda de 4Hz tras aplicar el estímulo (banda punteada). B) Cursos temporales del sumatorio del %NTP para los tramos de frecuencias indicadas (<3Hz, 3-6Hz y 30-100Hz). Se representan los segmentos de tiempo utilizados para obtener el %NTP promedio ($n=10$ puntos en cada caso). C) Valores de %NTP promedio para cada situación experimental.



Se pueden observar diferencias en la actividad relativa de ondas Delta ($CT_{PRE\delta}=58.67 \pm 1.01\%$ vs. $CT_{POST\delta}=29.59 \pm 2.51\%$, $p<0.001$, $n=10$) y Theta ($CT_{PRE\theta}=21.66 \pm 0.65\%$ vs. $CT_{POST\theta}=46.12 \pm 2.20\%$, $p<0.001$, $n=10$) tras el estímulo, así como en el rango Gamma ($CT_{pre\gamma}=4.48 \pm 0.12\%$ vs. $CT_{POST\gamma}=6.96 \pm 0.31\%$, $p<0.001$, $n=10$). La inyección de cafeína (CAF) provoca un descenso de actividad Delta y un aumento de actividad Theta en el estado basal ($CAF_{PRE\delta}=35.05 \pm 1.24\%$, $n=10$; $CAF_{PRE\theta}=40.12 \pm 0.76\%$, $n=10$), que permite que la potencia alcanzada tras el estímulo sea mayor que en la situación control ($CT_{POST\theta}=46.12 \pm 2.20\%$, $CAF_{POST\theta}=53.34 \pm 2.54\%$, $p<0.001$, $n=10$). D) Trazos originales de un caso representativo de la situación promedio de cada grupo experimental.

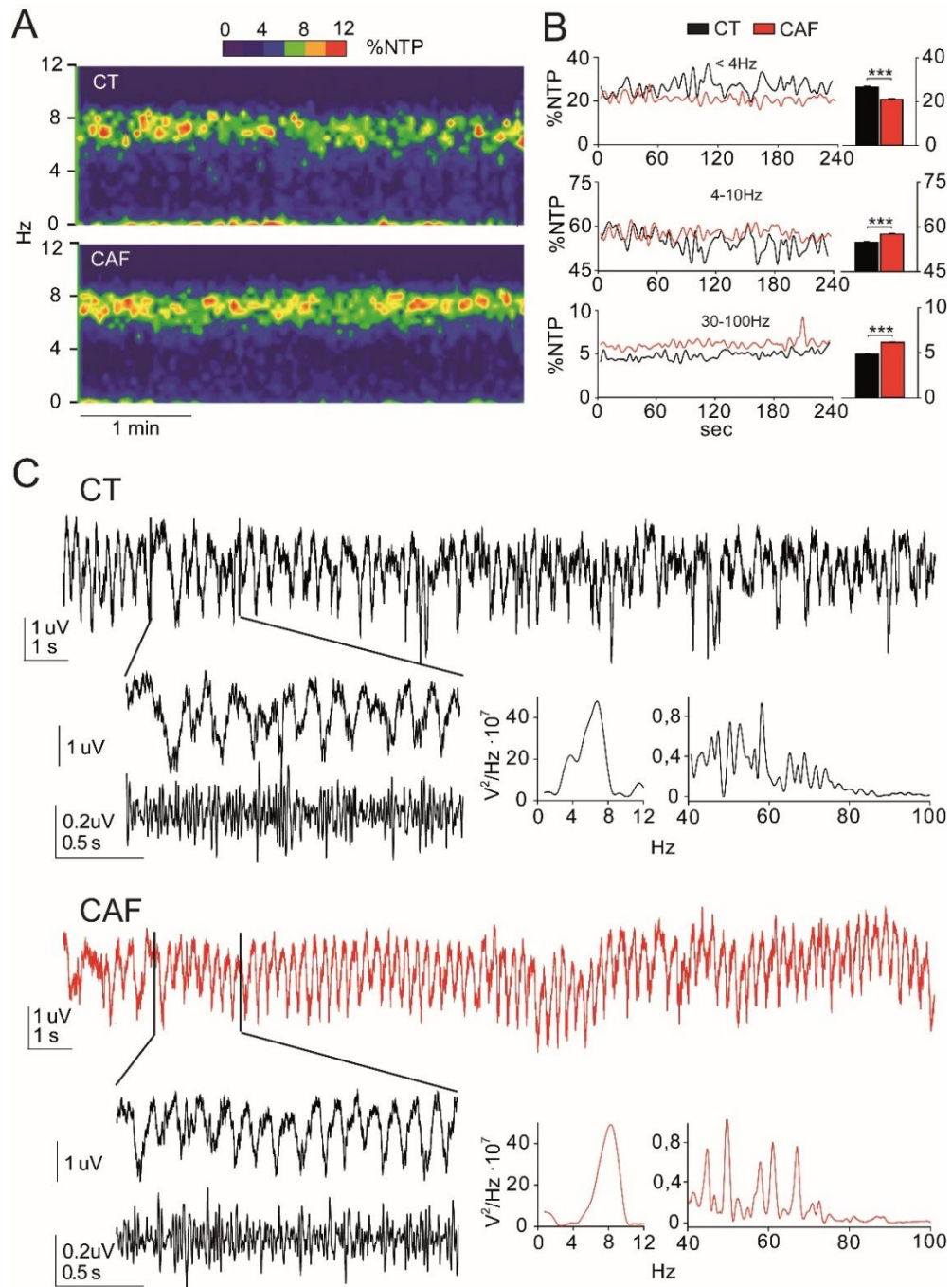
La administración de cafeína provocó que el estado PRE se caracterizara por el predominio de los ritmos Theta frente a los Delta ($CAF\delta_{pre}=35.05 \pm 1.24\%$ vs $CAF\theta_{post}=40.12 \pm 0.75\%$) y que la variación en ambos tras el estímulo ($CAF\delta_{pre}=35.05 \pm 1.24\%$ vs $CAF\delta_{post}=25.72 \pm 2.19\%$, $p<0.05$, $n=10$; $CAF\theta_{pre}=40.12 \pm 0.76\%$ vs. $CAF\theta_{post}=53.34 \pm 2.54\%$, $p<0.001$, $n=10$) fuese relativamente menor que en los casos CT, alcanzando, sin embargo, mayores niveles de %NTP en términos absolutos ($CT\theta_{post}=46.12 \pm 2.20\%$, $CAF\theta_{post}=53.34 \pm 2.54\%$, $p<0.001$, $n=10$). Estos datos sugieren que la cafeína incrementa la actividad rítmica Theta basal en animales anestesiados, permitiendo una mayor respuesta ante estímulos somáticos de carácter exploratorio.

LA CAFEÍNA PRODUCE UNA SINCRONIZACIÓN DE LOS RITMOS THETA HIPOCAMPALES EN ANIMALES DESPIERTOS

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en condiciones controladas en animales anestesiados, nuestro siguiente paso fue comprobar la acción de la cafeína sobre la actividad rítmica Theta y Delta en animales despiertos y en movimiento. Los resultados (Fig. 30) muestran que la administración de cafeína provocó un incremento del promedio de potencia en los rangos Theta ($CT\theta=54.93 \pm 0.39\%$ vs.

➔ **Figura 30. La cafeína incrementa el ritmo theta en el animal despierto.**

Comportamiento promedio de cinco animales, durante cuatro minutos, en las situaciones CT y CAF. A) Espectros del %NTP donde se observa una mayor densidad de potencia en la banda de los 6-10Hz en presencia de cafeína. B) Cursos temporales del sumatorio de los rangos de frecuencia indicados y representación del valor promedio de los cuatro minutos de estudio ($n=80$ puntos). La administración de cafeína provocó un incremento en la densidad de energía normalizada (%NTP) en los rangos Theta, entre 4 y 10Hz, ($CT\theta=54.93 \pm 0.39\%$ vs. $CAF\theta=57.61 \pm 0.21\%$, ***: $p<0.001$, $n=80$) y Gamma, entre 30 y 100Hz, ($CT\gamma=4.90 \pm 0.06\%$ vs. $CAF\gamma=6.15 \pm 0.06\%$, ***: $p<0.001$, $n=80$) así como una



disminución en el rango de frecuencias Delta, menores de 4Hz (CT δ =26.30 \pm 0.42% vs. CAF δ =21.0 \pm 0.23%, ***: p<0.001, n=80) durante la exploración. C) Segmentos originales de dos registros representativos de ambas situaciones experimentales. Los detalles muestran las frecuencias predominantes y un segmento filtrado entre 40-100 Hz para poner en relieve las frecuencias Gamma. Los espectros de frecuencias pertenecen al tramo representado en primera instancia.

CAF θ =57.61 \pm 0.21%, $p < 0.001$, $n=80$) y Gamma (CT γ =4.90 \pm 0.06% vs. CAF γ =6.15 \pm 0.06%, $p < 0.001$, $n=80$) así como una disminución de actividad Delta (CT δ =26.30 \pm 0.42% vs. CAF δ =21.0 \pm 0.23%, $p < 0.001$, $n=80$) a lo largo de los cuatro minutos de deambulaci3n.

EL AUMENTO DE ACTIVIDAD RÍTMICA PRODUCIDO POR LA CAFEÍNA ES BLOQUEADO POR EL ANTAGONISMO DE TrkB

Estudios previos demuestran que ANA-12 aplicado sistémicamente es un antagonista efectivo de la acci3n de TrkB (Cazorla *et al.*, 2011) y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en rodajas de hipocampo, investigamos si los cambios provocados por la cafeína en la actividad rítmica de esta estructura eran afectados por el bloqueo de los receptores TrkB a nivel sistémico. La inyecci3n de ANA-12 (i.p, 1mg/kg) cuatro horas antes de la administraci3n de cafeína, es capaz de bloquear los efectos de ésta sobre la actividad rítmica en el rango de las frecuencias Theta (Fig. 31, un animal representativo), indicando que este efecto est1 mediado por el receptor TrkB.

Esto fue corroborado en un conjunto de animales ($n = 4$) a los que se les aplic3 una serie de protocolos de registro basal (BAS), con cafeína (CAF) y con cafeína tras una administraci3n previa de ANA-12 (+ANA) cuatro horas antes. Los datos est1n reflejados en la Figura 32 donde se aprecia una desaparici3n del cambio provocado por la cafeína sobre la actividad rítmica Theta en los casos tratados previamente con ANA-12 (Fig. 32A, CAF=0,17 \pm 0,04, $n=5$ vs. +ANA=-0,05 \pm 0,03, $n=6$). Esta diferencia puede observarse en la disminuci3n de sincronizaci3n en Theta a nivel individual (Fig. 32B y 32C). Por lo tanto, podemos concluir, a partir de los datos

obtenidos, que el receptor de BDNF, TrkB, interviene en el mecanismo por el cual la cafeína modifica la actividad rítmica registrada en el hipocampo en animales despiertos.

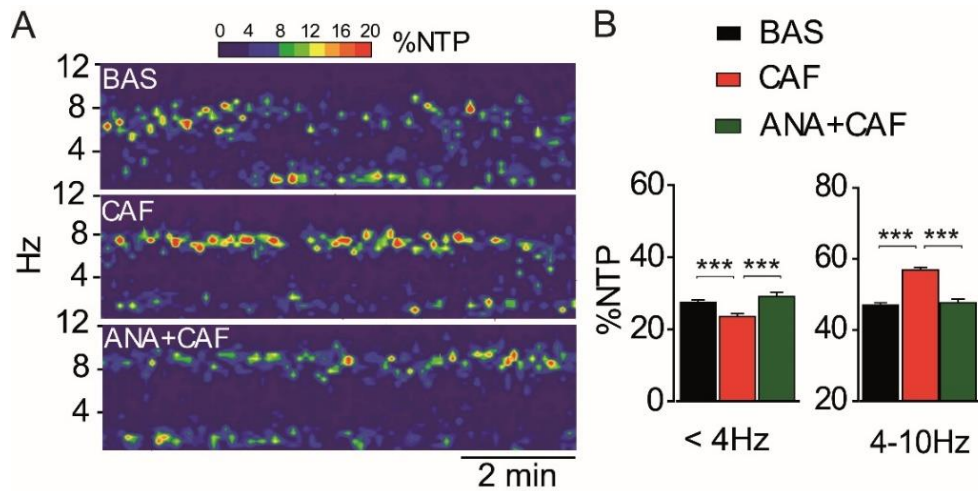


Figura 31. El bloqueo de TrkB impide la acción de la cafeína sobre los ritmos hipocampales. Los datos muestran el promedio, durante días consecutivos, de la actividad registrada en un animal representativo. A) Espectros de los porcentajes de energía total normalizada (%NTP) para cada situación experimental. Puede observarse cómo con cafeína (CAF, 10mg/Kg) aparece una mayor densidad de energía constante en el rango de frecuencias Theta comparada con la situación basal (BAS) que no se observa al administrar previamente ANA-12 (ANA+CAF). B) Gráficos de barras de los valores promedios para cada condición. Los efectos provocados por la cafeína en el %NTP de los rangos de frecuencia Theta y Delta fueron bloqueados por la administración previa de ANA-12 (i.p, 1mg/Kg) ($CAF_{\theta}=56.88 \pm 0.72\%$ vs. $CAF+ANA_{\theta}=47.63 \pm 1.03\%$; $CAF_{\delta}=23.50 \pm 0.82\%$ vs. $CAF + ANA_{\delta}=29.01 \pm 1.21\%$; ***: $p<0.001$, $n=80$), cuatro horas antes de la administración de cafeína, no observándose diferencias con los valores basales.

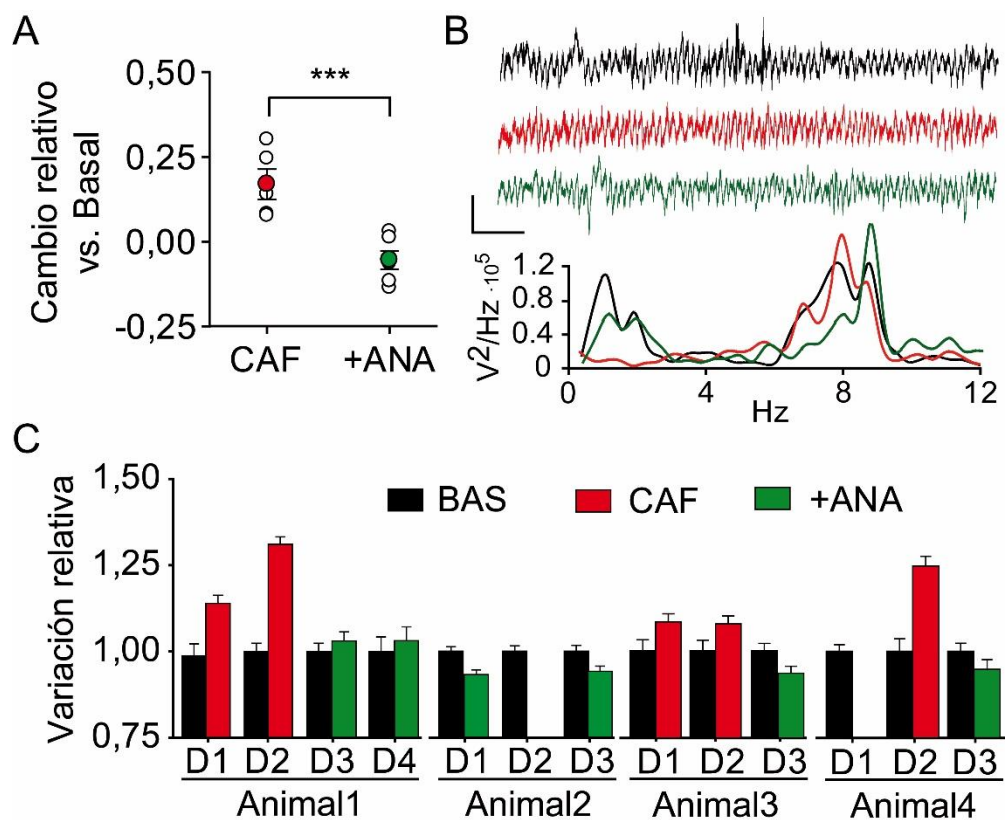


Figura 32. ANA-12 por vía intraperitoneal evita el incremento de la actividad Theta provocado por la cafeína. A) Valor relativo, con respecto al nivel basal, de la actividad Theta tras la administración de cafeína inyectando vehículo (CAF) o ANA-12 (+ANA) cuatro horas antes. Se observan diferencias significativas (CAF=0,17 ± 0,04, n=5 vs. +ANA=-0,05 ± 0,03, n=6; ***: p<0,001) que indican la reversión del efecto generado por la cafeína cuando el antagonista está presente. B) Trazos originales, de un mismo periodo de tiempo de registro para cada situación experimental representativos del estado promedio. Debajo se muestran los espectros de frecuencias correspondientes a cada tramo donde puede verse que, previa administración de ANA-12, se bloquea el efecto producido por la inyección de cafeína. C) Desglose de los resultados obtenidos para cada animal utilizado en el análisis y cada día de registro (D1-D4).

— [...] ves allí, amigo Sancho Panza, donde se descubren treinta o pocos más desaforados gigantes, con quien pienso hacer batalla y quitarles a todos las vidas, con cuyos despojos comenzaremos a enriquecer [...].

— ¿Qué gigantes? — dijo Sancho Panza.

— Aquellos que allí ves — respondió su amo —, de los brazos largos, que los suelen tener algunos de casi dos leguas.

— Mire vuestra merced — respondió Sancho — que aquellos que allí se parecen no son gigantes, sino molinos de viento, y lo que en ellos parecen brazos son las aspas, que, volteadas del viento, hacen andar la piedra del molino.

Pasaje de *Don Quijote de La Mancha* de Miguel de Cervantes.

DISCUSIÓN

En base a distintas líneas de investigación, se ha demostrado que el sistema de señalización mediado por la neurotrofina BDNF y su receptor específico TrkB regula la plasticidad neuronal a través de los cambios que provocan tanto en la morfología como en la eficacia sináptica (Figurov *et al.*, 1996; Schildt *et al.*, 2013; Kellner *et al.*, 2014). En particular, la secreción de BDNF dependiente de la actividad neuronal tiene un papel fundamental en la LTP (Gartner y Staiger, 2002; Woo *et al.*, 2005), una forma de plasticidad sináptica a largo plazo que se utiliza como modelo celular y molecular de los procesos de memoria y aprendizaje (Bliss y Lomo, 1973; Bailey *et al.*, 2000). Por otro lado, existen evidencias experimentales que indican que el consumo de cafeína puede modificar el sistema de regulación mediado por BDNF (Moy y McNay, 2013). No obstante, aspectos fundamentales de los posibles mecanismos involucrados en estas modificaciones inducidas por la cafeína y, en particular, sus acciones a nivel sináptico, son desconocidos. Los resultados de este trabajo demuestran, por primera vez, que el uso de una concentración de cafeína próxima a la de un consumo moderado desencadena una serie de eventos celulares y electrofisiológicos independientes de receptores tipo NMDA, que implican la secreción de BDNF, la activación de cascadas de señalización de la vía PI3K, desencadenadas por la fosforilación de TrkB a nivel postsináptico, y cambios en la actividad rítmica del hipocampo, también mediada por el receptor TrkB, relacionada con la exploración espacial.

EFECTO DE LA CAFEÍNA SOBRE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA

La cafeína produce cambios evidentes en el comportamiento animal (Ardais *et al.*, 2014) y mejora las capacidades cognitivas humanas (Borota *et al.*, 2014). Incluso, se ha propuesto que tiene efectos beneficiosos sobre los cambios conductuales que se observan en modelos animales de enfermedad de Alzheimer (Han *et al.*, 2013). A pesar del interés que despierta esta sustancia por sus efectos sobre el sistema nervioso y su posible aplicación terapéutica, su acción sobre la transmisión sináptica no se conoce completamente. Los resultados presentados demuestran que la cafeína a concentraciones de consumo habitual, provoca una LTP independiente de receptores NMDA que no implica cambios en el sistema inhibitorio GABAérgico local, lo que ha sido observado también al emplear dosis elevadas (Martín y Buño, 2003). Este incremento de la eficacia sináptica también ha sido observada por otros autores utilizando concentraciones más elevadas, 300 μM , (Simons *et al.*, 2012) así como concentraciones más bajas, 30 μM , durante más tiempo (40 min), aunque en este caso la potenciación de la transmisión sináptica se mantiene únicamente durante el tiempo de aplicación de cafeína (Costenla *et al.*, 2010).

Mediante la utilización del paradigma de la facilitación por pares de pulsos (Schulz *et al.*, 1994), hemos observado que el $\text{PPF}_{\text{ratio}}$ a largo plazo presenta valores similares a los obtenidos en condiciones basales, previas a la inducción de la potenciación con cafeína. Este resultado descarta los mecanismos presinápticos como origen del mantenimiento de la LTP_{CAF} indicando, indirectamente, que los cambios en esta ventana temporal deben ocurrir a nivel postsináptico (Schulz *et al.*,

1994). Además, sí se ha observado el descenso del PPF_{ratio} en las etapas iniciales de la potenciación, lo que se asocia al efecto inmediato de la cafeína sobre los terminales presinápticos, tanto por su acción sobre los receptores A_1 como sobre la dinámica de apertura de los canales de rianodina intracelulares (Martin y Buno, 2003; Sato y Kamiya, 2011). Por tanto, la cafeína a una concentración dentro de los márgenes de consumo habitual (100 μ M) promueve el incremento de liberación de glutamato en la etapa de inducción y la activación de distintos eventos postsinápticos en la fase de mantenimiento.

SECRECIÓN DE BDNF EN RESPUESTA A LA CAFEÍNA

Datos experimentales previos indican que el BDNF puede secretarse activamente de forma complementaria a la secreción constitutiva, sobre todo asociada a ciertos protocolos de estimulación eléctrica responsables de la inducción de LTP (Gartner y Staiger, 2002; Woo *et al.*, 2005). Existen evidencias experimentales que demuestran que este fenómeno puede ocurrir en cultivos de neuronas de hipocampo (Canossa *et al.*, 1997; Santi *et al.*, 2006) y que, por otra parte, la cafeína afecta a la expresión de la neurotrofina en hipocampo *in vivo* (Moy y McNay, 2013). No obstante, hay pocas evidencias que hayan relacionado la acción de la cafeína con la secreción de BDNF en rodajas de hipocampo. Empleando técnicas de ELISA para la detección de BDNF en el medio extracelular, hemos demostrado que la cafeína induce la secreción activa de esta neurotrofina en rodajas de hipocampo.

Actualmente se considera que el BDNF puede liberarse tanto a nivel pre como postsináptico (Lessmann y Brigadski, 2009; Edelmann *et al.*, 2014) y algunos autores proponen que su origen depende del tipo de estímulo aplicado (Matsuda *et*

al., 2009). Lo que sí se recoge en los trabajos citados es el mecanismo a través del cual se produce la secreción activa, ya sea mediante protocolos eléctricos o químicos, siendo necesario, en ambos casos, el aumento de calcio intracelular. Nuestros resultados confirman esta dependencia del Ca^{2+} en la secreción de BDNF en el hipocampo inducida por cafeína, al mostrar que la concentración detectada de la neurotrofina en el medio extracelular disminuye a los niveles basales en presencia de rianodina. Por otra parte, esta liberación de BDNF depende de la actividad neuronal, tal como lo demuestran los experimentos realizados con TTX. Se sabe que la cafeína, además de actuar sobre los receptores de adenosina como antagonista, es capaz de activar la movilización de calcio desde los reservorios intracelulares, a través de la apertura de los canales de calcio sensibles a rianodina (Fredholm *et al.*, 1999). Además se ha comprobado recientemente que en las fibras musgosas del hipocampo, la cafeína actúa incrementando la liberación de neurotransmisor a través de los dos mecanismos (Sato y Kamiya, 2011) independientes uno del otro.

Nuestra hipótesis se apoya, además, en el uso de ratones modificados genéticamente, heterocigotos para BDNF. Existen evidencias previas que demuestran cómo esta deficiencia de BDNF es suficiente para provocar anormalidades en procesos de LTP clásicos como los observados en las fibras musgosas (Schildt *et al.*, 2013) y en CA1 (Korte *et al.*, 1995). Recientemente se ha señalado que los animales heterocigotos para BDNF muestran déficits en la LTP *in vivo*, y que estos recuperan niveles normales de LTP tras el enriquecimiento de su entorno, a la vez que aumentan su expresión de BDNF en el cerebro (Novkovic *et al.*, 2015). Nuestros resultados indican que la secreción basal de BDNF era menor

en los animales BDNF^{+/-} y que, además, no se observa el incremento de secreción en respuesta a la cafeína. Por otro lado, los experimentos de LTP_{CAF} muestran una potenciación sináptica de menor magnitud en los ratones BDNF^{+/-}, lo que se correlaciona con lo observado empleando protocolos de LTP clásica (Korte *et al.*, 1995). La falta de una abolición total de la LTP_{CAF} en el animal BDNF^{+/-} puede explicarse por mecanismos compensatorios que actúan durante el mantenimiento de la LTP y que no se observan al realizar la cuantificación de BDNF secretado al medio. Por ejemplo, podría ocurrir gracias a la capacidad de captura por endocitosis y reciclado del BDNF en las sinapsis hipocámpales (Santi *et al.*, 2006). En base a los datos obtenidos y a los publicados previamente, podemos concluir que la cafeína inicialmente produce un incremento en la probabilidad de liberación de glutamato, mediado por receptores A₁ y Ca²⁺ intracelular, paralelo a la secreción de BDNF, por un mecanismo también Ca²⁺-dependiente desde la terminal presináptica, tal como lo indica el estudio de la PPF y los experimentos con TTX.

ACCIONES DE LA SEÑALIZACIÓN BDNF/TRKB *IN VITRO*

El BDNF es un factor neurotrófico de gran importancia, por lo que ejerce un amplio abanico de acciones en el desarrollo y mantenimiento de las funciones neuronales (Nakagawara *et al.*, 1994; Chao, 2003). Dejando aparte las acciones inherentes a su naturaleza neurotrófica, al BDNF se lo relaciona con multitud de posibles efectos sobre la transmisión sináptica (Figurov *et al.*, 1996; Aicardi *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008; Novkovic *et al.*, 2015), tanto a nivel pre como postsináptico (Pereira *et al.*, 2006), así como una amplia variedad de acciones que su receptor TrkB ejerce a nivel intracelular que incluyen la activación de corrientes iónicas (Blum *et al.*, 2002; Ahn *et al.*, 2007) y la regulación tanto de la síntesis proteica *de novo* (Lu *et al.*,

2008) como del tráfico y función de varios tipos de receptores de membrana (Itami *et al.*, 2003; Caldeira *et al.*, 2007). Todo ello hace que el sistema BDNF/TrkB sea altamente flexible. Los resultados obtenidos de nuestro trabajo indican que el mantenimiento de la LTP_{CAF} tiene un origen postsináptico, dados los valores de PPF_{ratio} obtenidos a largo plazo. Por lo tanto, es factible, en base al conocimiento actual de las acciones del BDNF, que este interaccione con los receptores TrkB postsinápticos cuando es secretado en respuesta a la cafeína, induciendo los cambios intracelulares necesarios para el mantenimiento de la LTP_{CAF}.

La literatura indica que entre las acciones más conocidas de TrkB se cuenta la activación de las vías intracelulares mediadas por MAPK, PLC γ y PI3K (Carvalho *et al.*, 2008; Minichiello, 2009). La activación de las rutas PI3K y MAPK se realiza a través de distintas proteínas adaptadoras, Shc e IRS (Minichiello, 2009), mientras que, por otro lado, la PLC γ posee unos dominios de interacción directa con TrkB (Carvalho *et al.*, 2008). Para comprobar la posible relación de estas vías con el mantenimiento de la LTP_{CAF}, se pusieron a prueba diferentes inhibidores. De ellos, únicamente la presencia de Wortmanina en el ACSF provocó la caída de los fEPSPs hasta niveles basales pasados 60 minutos tras la inducción con cafeína. Esto implica directamente a la ruta de PI3K/Akt/mTORC1 como principal responsable del proceso de mantenimiento de la LTP_{CAF}. Esta vía de señalización intracelular ha sido relacionada con los fenómenos de potenciación dependientes de BDNF demostrando su importancia en el mantenimiento de la LTP gracias al control de la iniciación de la translación ribosómica (Raymond *et al.*, 2002; Schratt *et al.*, 2004). Este efecto implica, además, la necesidad de síntesis proteica *de novo* en las dendritas (Santos *et al.*, 2010; Panja y Bramham, 2014) lo cual podría ser necesario

para el mantenimiento a largo plazo de la LTP_{CAF}. Algunos estudios han relacionado la actividad de la vía PI3K/Akt con la actividad del factor de transcripción AP-1 y el receptor intracelular NGFI-B (Huang *et al.*, 1996; Pekarsky *et al.*, 2001), ambos implicados en el control de genes de expresión rápida que se han visto modificados en tratamientos con cafeína (Svenningsson *et al.*, 1995a; 1995b). Por otro lado, los experimentos en los que se utilizaron inhibidores de p38-MAPK, MEK y PLC γ demostraron que estas rutas no están implicadas en la LTP_{CAF}. Sin embargo, el entrecruzamiento existente entre las tres vías de señalización (Minichiello, 2009; Panja y Bramham, 2014) no permite descartar por completo su participación en este tipo de plasticidad sináptica.

TrkB COMO DETECTOR DE COINCIDENCIA

La detección de una coincidencia temporal entre dos eventos es fundamental en el proceso del aprendizaje asociativo y la LTP clásica es un ejemplo de correlación temporal entre la actividad pre y postsináptica, en la que el receptor de NMDA actúa como elemento de detección entre ambas. El hecho de que el sistema de señalización de BDNF-TrkB tiene un papel fundamental en la neuromodulación y plasticidad sináptica no es nuevo y ha sido revisado de forma exhaustiva (Minichiello, 2009; Panja y Bramham, 2014). En 2002 ya se apuntaba a que la diversidad de señalización mediada por el sistema BDNF/TrkB y su relación con la regulación de la neurotransmisión, lo convertían en una clave importante de la detección de coincidencia (Tyler *et al.*, 2002). Incluso se ha estudiado cómo los mecanismos activadores de las vías relacionadas con PI3K/PDK1 (kinasa 3-fosfoinosítido-dependiente tipo 1) y AC/AMPc podrían ser considerados como sustratos de la detección de coincidencia en el emparejamiento y génesis de

respuestas condicionadas (Keifer y Zheng, 2015). Más allá de las cascadas de señalización activadas por TrkB, existen acciones directas sobre la excitabilidad de las membranas. Se ha observado que las neurotrofinas, sobre todo BDNF, son capaces de provocar una rápida despolarización, incluso a muy bajas concentraciones, mediada por la activación de TrkB (Kafitz *et al.*, 1999) y se ha determinado que existe una interacción directa entre TrkB y los canales de sodio de tipo Nav1.9 (Blum *et al.*, 2002). En las neuronas granulares de DG, por ejemplo, una aplicación local de BDNF sobre las dendritas provoca una despolarización que conlleva un flujo de Ca^{2+} a través de VGCCs (Kovalchuk *et al.*, 2002) que, acompañado de una leve estimulación eléctrica, produce una LTP en la que es necesaria la participación del receptor de NMDA. Teniendo en cuenta estos datos y que en nuestras condiciones experimentales no se observa una dependencia de estos receptores, es factible proponer que el receptor TrkB pueda actuar como un detector de coincidencia entre la liberación de neurotransmisor y BDNF desde la presinapsis y la activación de rutas de señalización postsinápticas que consolidarían el mantenimiento de la LTP_{CAF} . La cafeína, por tanto, actuaría presinápticamente provocando la secreción de BDNF y el incremento de liberación de glutamato activando, postsinápticamente, receptores AMPA y TrkB. Esto generaría una despolarización, en la que participarían los VGCCs, acompañada de la activación de rutas intracelulares (como la mediada por la PI3K) que promoverían la síntesis de proteínas *de novo*, creando un escenario propicio para generar respuestas celulares semejantes a las provocadas por la apertura de canales NMDA (Fig. 33).

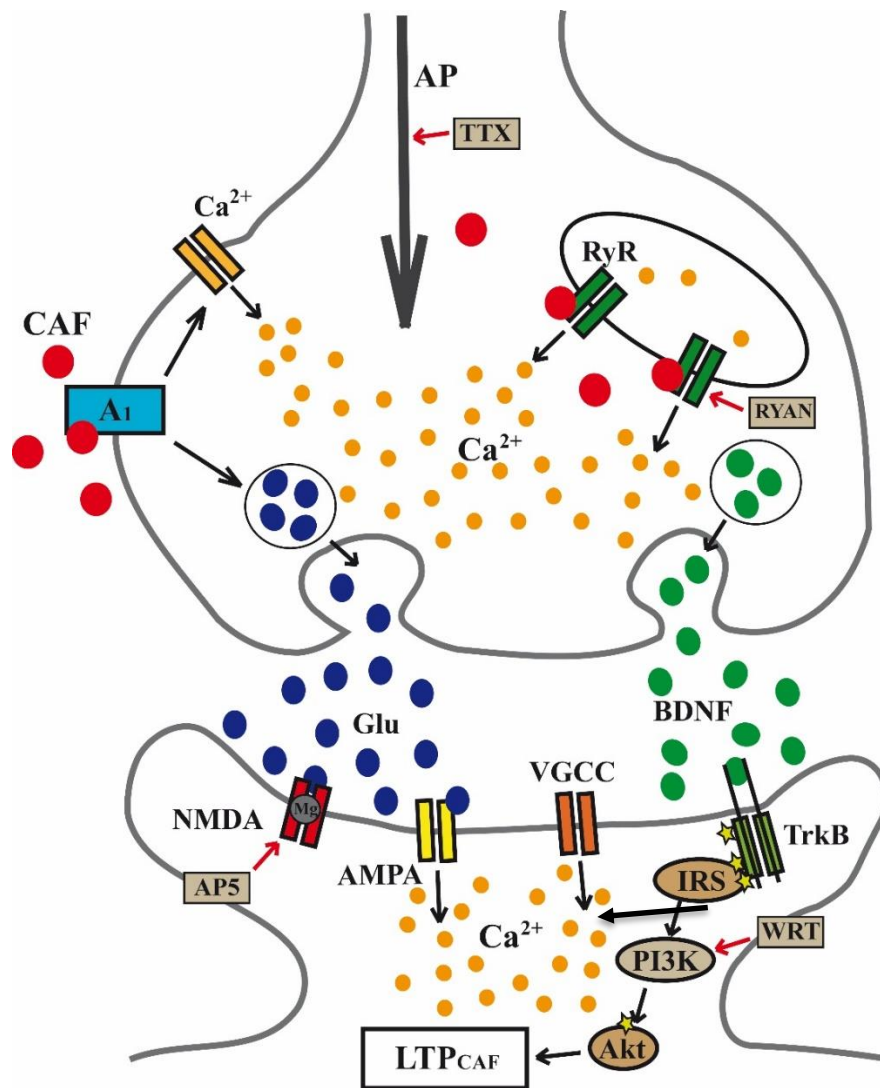


Figura 33. El sistema BDNF/TrkB como detector de coincidencia en la LTP_{CAF}. El diagrama resume el mecanismo de la LTP_{CAF} propuesto. La cafeína (CAF) antagoniza los receptores de adenosina A₁, promoviendo la apertura de canales de Ca²⁺ y aumentando la probabilidad de liberación de glutamato ante la llegada de potenciales de acción (PA). Además, la cafeína interacciona con los canales de Ca²⁺ sensibles a rianodina del retículo (RyR), incrementando la concentración de Ca²⁺ intracelular y provocando la secreción activa de BDNF. En la postsinapsis, el glutamato interacciona con los receptores tipo AMPA, que se abren y permiten la entrada de Na⁺ y, en menor grado, Ca²⁺, y tipo NMDA, que se mantienen bloqueados por el Mg²⁺. El BDNF interacciona con su receptor TrkB, que se autofosforila y provoca toda una serie de efectos intracelulares. Entre ellos la interacción con VGCCs, que genera corrientes de entrada de Ca²⁺, y la activación de la vía PI3K/Akt, a través de la proteína adaptadora IRS. Estas acciones, junto con el incremento de Ca²⁺ intracelular llevan a la estabilización de la LTP_{CAF} a largo plazo. Se indican los inhibidores y sus dianas de acción con flechas rojas.

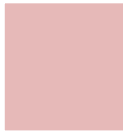
LA CAFEÍNA MODIFICA LA ACTIVIDAD RÍTMICA DEL HIPOCAMPO A TRAVÉS DEL RECEPTOR TrkB

Diversos estudios recientes indican que la cafeína afecta al rendimiento con que se llevan a cabo diferentes tareas relacionadas con la memoria (Ardais *et al.*, 2014; Borota *et al.*, 2014). En ellos se relaciona directamente la participación de los sistemas adenosinérgicos del hipocampo e incluso se hace referencia a que el BDNF podría estar implicado en la fase de consolidación de esta memoria. En el trabajo de Borota *et al.* se aplica un protocolo que minimiza los efectos no cognitivos de la cafeína, ya que se administra tras la realización de la tarea en cuestión, para asegurarse que se está modificando la fase de consolidación de la memoria a nivel del hipocampo. En otras publicaciones recientes señalan que el consumo crónico de cafeína contrarrestó la pérdida de memoria en dos modelos de Alzheimer en ratones de edad avanzada (Han *et al.*, 2013; Laurent *et al.*, 2014). Estos datos indican que existe un efecto directo de la cafeína sobre la realización de tareas relacionadas con el aprendizaje en el que no se modifican otros procesos como, por ejemplo, la atención. Paralelamente hay evidencias experimentales que relacionan la actividad rítmica cerebral, concretamente la actividad Theta-Gamma del hipocampo, con el proceso de aprendizaje (Jurado-Parras *et al.*, 2013), memoria espacial (Buzsaki y Moser, 2013), codificación del emplazamiento espacial (Harvey *et al.*, 2009) y la toma de decisiones (Belchior *et al.*, 2014). La relación entre esta actividad, el hipocampo y la memoria ha sido extensamente revisada desde principio de siglo (Buzsaki, 2002) hasta este mismo año (Wojtowicz y Mozrzymas, 2015).

En los experimentos realizados *in vivo* mostramos cómo la cafeína afecta la actividad rítmica Theta, en primer lugar, en animales anestesiados, descartando así

los posibles efectos estimulantes sobre la locomoción. Nuestros resultados señalan que una dosis de cafeína de 10 mg/Kg provoca un aumento de la proporción de actividad Theta en el estado basal del animal anestesiado. Este estado propicia la aparición, tras un estímulo somático, de un incremento transitorio de mayor magnitud que el registrado en la situación control. Estos datos se correlacionan con otras investigaciones donde se establece que la frecuencia promedio del rango Theta que presenta un animal en condiciones basales es un indicador del rendimiento en las curvas de aprendizaje obtenidas en diversas tareas (Santos *et al.*, 2008). En segundo lugar comprobamos la acción de la cafeína en animales despiertos. Las evidencias experimentales relacionan la actividad Theta con el aprendizaje ligado al contexto, la navegación y la codificación de la localización espacial del animal (Tort *et al.*, 2009; Buzsaki y Moser, 2013; Agarwal *et al.*, 2014; Belchior *et al.*, 2014). Por lo tanto, nuestro objetivo fue establecer si en condiciones de libre movimiento, explorando un entorno nuevo, la actividad Theta se modificaba tras la aplicación de cafeína. Los resultados mostraron que los animales tratados con una dosis de 10 mg/Kg de cafeína presentaban mayor proporción de actividad Theta, en promedio, durante el tiempo total de exploración del entorno. Descartados los efectos debidos a la estimulación locomotora y al aumento del estado de alerta generados por la cafeína y teniendo en cuenta nuestros datos obtenidos *in vitro* y experimentos previos que relacionan al BDNF con la modulación de la plasticidad sináptica *in vivo* a través de protocolos de estimulación basados en la actividad Theta (Kramar *et al.*, 2004; Novkovic *et al.*, 2015), el siguiente paso fue determinar si el incremento en la actividad Theta estaba regulado por sistema de señalización BDNF-TrkB. Para ello, utilizamos ANA-12, un antagonista del receptor TrkB que

tiene efectos sobre el comportamiento de animales despiertos, sin modificar su actividad locomotora total (Cazorla *et al.*, 2011). La administración de ANA-12, previo al tratamiento con cafeína, contrarrestó el incremento de actividad Theta observado en los registros control donde se inyectó el vehículo. En resumen, los experimentos realizados en modelos *in vivo* señalan que la cafeína provoca un aumento de la actividad Theta registrada en CA1, efecto que se bloquea cuando se administra previamente un antagonista de TrkB, indicando que el sistema de señalización BDNF-TrkB está implicado en la regulación de la actividad sincronizada relacionada con la consolidación de la memoria en el hipocampo.



— It is a capital mistake to theorize before one has data. Insensibly one begins to twist facts to suit theories, instead of theories to suit facts.

Es un error capital teorizar antes de poseer datos. Imperceptiblemente, uno comienza a deformar los hechos para hacerlos encajar en las teorías en lugar de encajar las teorías en los hechos.

Sherlock Holmes en *A Scandal in Bohemia* de Arthur Conan Doyle.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo experimental podemos concluir que:

1. La cafeína a dosis de consumo habitual en humanos induce una LTP independiente de receptores NMDA en las sinapsis glutamatérgicas de CA1 que es independiente de la actividad inhibitoria GABAérgica mediada por receptores tipo A.
2. Los posibles mecanismos involucrados en esta forma de LTP inducida por cafeína se localizan a nivel presináptico en el momento de su inducción y postsinápticamente durante su consolidación.
3. La cafeína provoca la secreción activa de BDNF en el hipocampo a través de mecanismos dependientes de la actividad neuronal y de la movilización de calcio intracelular a través de canales sensibles a rianodina.
4. El BDNF, a través de su receptor específico TrkB, activa la vía intracelular de señalización PI3K/Akt/mTORC1, que es necesaria para el mantenimiento de la LTP_{CAF} a nivel postsináptico.
5. La cafeína modifica la relación de los ritmos Delta-Theta en modelos animales anestesiados lo que permite una mayor respuesta ante estímulos somáticos de carácter exploratorio.
6. En animales despiertos, la cafeína incrementa la actividad Theta registrada en CA1 y este efecto es bloqueado por el antagonista del receptor TrkB ANA-12, lo que indica la participación del sistema de señalización BDNF-TrkB en la regulación de la actividad rítmica del hipocampo relacionada con la consolidación de la memoria espacial.



BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, G., Stevenson, IH., Berenyi, A., Mizuseki, K., Buzsaki, G y Sommer, FT (2014). "Spatially distributed local fields in the hippocampus encode rat position." Science **344**(6184): 626-630.

Ahn, M., Beacham, D., Westenbroek, RE., Scheuer, T y Catterall, WA (2007). "Regulation of Na(v)1.2 channels by brain-derived neurotrophic factor, TrkB, and associated Fyn kinase." J Neurosci **27**(43): 11533-11542.

Aicardi, G., Argilli, E., Cappello, S., Santi, S., Riccio, M., Thoenen, H y Canossa, M (2004). "Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(44): 15788-15792.

Angelucci, ME., Cesario, C., Hiroi, RH., Rosalen, PL y Da Cunha, C (2002). "Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze." Braz J Med Biol Res **35**(10): 1201-1208.

Ardais, AP., Borges, MF., Rocha, AS., Sallaberry, C., Cunha, RA y Porciuncula, LO (2014). "Caffeine triggers behavioral and neurochemical alterations in adolescent rats." Neuroscience **270**: 27-39.

Azmitia, EC (1981). "Bilateral serotonergic projections to the dorsal hippocampus of the rat: simultaneous localization of 3H-5HT and HRP after retrograde transport." J Comp Neurol **203**(4): 737-743.

Bailey, CH., Giustetto, M., Huang, Y-Y., Hawkins, RD y Kandel, ER (2000). "Is Heterosynaptic modulation essential for stabilizing hebbian plasiticity and memory." Nature Reviews Neuroscience **1**(1): 11-20.

Belchior, H., Lopes-Dos-Santos, V., Tort, AB y Ribeiro, S (2014). "Increase in hippocampal theta oscillations during spatial decision making." Hippocampus **24**(6): 693-702.

Bliss, TV y Collingridge, GL (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-39.

Bliss, TV y Lomo, T (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-356.

Blum, R., Kafitz, KW y Konnerth, A (2002). "Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9." Nature **419**(6908): 687-693.

Borota, D., Murray, E., Keceli, G., Chang, A., Watabe, JM., Ly, M., Toscano, JP y Yassa, MA (2014). "Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans." Nat Neurosci **17**(2): 201-203.

Buzsaki, G (2002). "Theta oscillations in the hippocampus." Neuron **33**(3): 325-340.

Buzsaki, G y Moser, EI (2013). "Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system." Nat Neurosci **16**(2): 130-138.

Caldeira, MV., Melo, CV., Pereira, DB., Carvalho, R., Correia, SS., Backos, DS., Carvalho, AL., Esteban, JA y Duarte, CB (2007). "Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons." J Biol Chem **282**(17): 12619-12628.

Canossa, M., Griesbeck, O., Berninger, B., Campana, G., Kolbeck, R y Thoenen, H (1997). "Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13279-13286.

Carvalho, AL., Caldeira, MV., Santos, SD y Duarte, CB (2008). "Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses." Br J Pharmacol **153** Suppl 1: S310-324.

Cazorla, M., Premont, J., Mann, A., Girard, N., Kellendonk, C y Rognan, D (2011). "Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice." J Clin Invest **121**(5): 1846-1857.

Costenla, AR., Cunha, RA y de Mendonca, A (2010). "Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity." J Alzheimers Dis **20** Suppl 1: S25-34.

Chao, MV (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." Nat Rev Neurosci **4**(4): 299-309.

De Felipe Oroquieta, J., Markram, H y Wagensberg, J (2010). Paisajes Neuronales: Homenaje a Santiago Ramón y Cajal. Madrid, Centro Superior de Investigaciones Científicas: 336.

Dudek, SM y Bear, MF (1992). "Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4363-4367.

Duffy, SN., Craddock, KJ., Abel, T y Nguyen, PV (2001). "Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory." Learn Mem **8**(1): 26-34.

Dunwiddie, TV y Masino, SA (2001). "The role and regulation of adenosine in the central nervous system." Annu Rev Neurosci **24**: 31-55.

- Durlach, PJ** (1998). "The effects of a low dose of caffeine on cognitive performance." Psychopharmacology (Berl) **140**(1): 116-119.
- Edelmann, E., Lessmann, V y Brigadski, T** (2014). "Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity." Neuropharmacology **76 Pt C**(0): 610-627.
- Eichenbaum, H y Cohen, NJ** (2014). "Can we reconcile the declarative memory and spatial navigation views on hippocampal function?" Neuron **83**(4): 764-770.
- Fernandez de Sevilla, D., Nuñez, A., Borde, M., Malinow, R y Buño, W** (2008). "Cholinergic-mediated IP3-receptor activation induces long-lasting synaptic enhancement in CA1 pyramidal neurons." J Neurosci **28**(6): 1469-1478.
- Figurov, A., Pozzo-Miller, LD., Olafsson, P., Wang, T y Lu, B** (1996). "Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus." Nature **381**(6584): 706-709.
- Fisahn, A., Pike, FG., Buhl, EH y Paulsen, O** (1998). "Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro." Nature **394**(6689): 186-189.
- Fredholm, B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A y Zvartau, E** (1999). "Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use." Pharmacological Reviews **51**(1): 83-133.
- Frey, U., Krug, M., Reymann, KG y Matthies, H** (1988). "Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro." Brain Res **452**(1-2): 57-65.
- Frey, U y Morris, RG** (1997). "Synaptic tagging and long-term potentiation." Nature **385**(6616): 533-536.
- Gartner, A y Staiger, V** (2002). "Neurotrophin secretion from hippocampal neurons evoked by long-term-potential-inducing electrical stimulation patterns." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6386-6391.
- Girardeau, G., Benchenane, K., Wiener, SI., Buzsaki, G y Zugaro, MB** (2009). "Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory." Nat Neurosci **12**(10): 1222-1223.
- Gray, CM** (1994). "Synchronous oscillations in neuronal systems: mechanisms and functions." J Comput Neurosci **1**(1-2): 11-38.
- Griesbeck, O., Canossa, M., Campana, G., Gartner, A., Hoener, MC., Nawa, H., Kolbeck, R y Thoenen, H** (1999). "Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity." Microsc Res Tech **45**(4-5): 262-275.

Gruart, A., Leal-Campanario, R., Lopez-Ramos, JC y Delgado-Garcia, JM (2015). "Functional basis of associative learning and their relationships with long-term potentiation evoked in the involved neural circuits: Lessons from studies in behaving mammals." Neurobiol Learn Mem.

Gruart, A., Munoz, MD y Delgado-Garcia, JM (2006). "Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice." J Neurosci **26**(4): 1077-1087.

Gruart, A., Sciarretta, C., Valenzuela-Harrington, M., Delgado-Garcia, JM y Minichiello, L (2007). "Mutation at the TrkB PLC{gamma}-docking site affects hippocampal LTP and associative learning in conscious mice." Learn Mem **14**(1): 54-62.

Han, K., Jia, N., Li, J., Yang, L y Min, LQ (2013). "Chronic caffeine treatment reverses memory impairment and the expression of brain BDNF and TrkB in the PS1/APP double transgenic mouse model of Alzheimer's disease." Mol Med Rep **8**(3): 737-740.

Hanse, E y Gustafsson, B (1994). "TEA elicits two distinct potentiations of synaptic transmission in the CA1 region of the hippocampal slice." J Neurosci **14**(8): 5028-5034.

Harris, EW y Cotman, CW (1986). "Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists." Neurosci Lett **70**(1): 132-137.

Harvey, CD., Collman, F., Dombeck, DA y Tank, DW (2009). "Intracellular dynamics of hippocampal place cells during virtual navigation." Nature **461**(7266): 941-946.

Holscher, C., Anwyl, R y Rowan, MJ (1997). "Stimulation on the positive phase of hippocampal theta rhythm induces long-term potentiation that can be depotentiated by stimulation on the negative phase in area CA1 in vivo." J Neurosci **17**(16): 6470-6477.

Hu, H., Vervaeke, K y Storm, JF (2002). "Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na⁺ current in rat hippocampal pyramidal cells." J Physiol **545**(Pt 3): 783-805.

Huang, C., Ma, WY y Dong, Z (1996). "Requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor-induced AP-1 transactivation and transformation in JB6 P⁺ cells." Molecular and Cellular Biology **16**(11): 6427-6435.

Huang, YY y Malenka, RC (1993). "Examination of TEA-induced synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus: the role of voltage-dependent Ca²⁺ channels in the induction of LTP." J Neurosci **13**(2): 568-576.

- Itami, C., Kimura, F., Kohno, T., Matsuoka, M., Ichikawa, M., Tsumoto, T y Nakamura, S** (2003). "Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of "silent" synapses in the developing mouse barrel cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 13069-13074.
- Johansson, B., Lindstrom, K y Fredholm, BB** (1994). "Differences in the regional and cellular localization of c-fos messenger RNA induced by amphetamine, cocaine and caffeine in the rat." Neuroscience **59**(4): 837-849.
- Jurado-Parras, MT., Sanchez-Campusano, R., Castellanos, NP., del-Pozo, F., Gruart, A y Delgado-Garcia, JM** (2013). "Differential contribution of hippocampal circuits to appetitive and consummatory behaviors during operant conditioning of behaving mice." J Neurosci **33**(6): 2293-2304.
- Kafitz, KW., Rose, CR., Thoenen, H y Konnerth, A** (1999). "Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors." Nature **401**(6756): 918-921.
- Kandel, ER** (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. Science. United States. **294**: 1030-1038.
- Keifer, J y Zheng, Z** (2015). "Coincidence detection in a neural correlate of classical conditioning is initiated by bidirectional 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 signalling and modulated by adenosine receptors." J Physiol **593**(7): 1581-1595.
- Kellner, Y., Goedecke, N., Dierkes, T., Thieme, N., Zagrebelsky, M y Korte, M** (2014). "The BDNF effects on dendritic spines of mature hippocampal neurons depend on neuronal activity." Frontiers in Synaptic Neuroscience **6**.
- Koponen, E., Voikar, V., Riekk, R., Saarelainen, T., Rauramaa, T., Rauvala, H., Taira, T y Castren, E** (2004). "Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB-PLCgamma pathway, reduced anxiety, and facilitated learning." Mol Cell Neurosci **26**(1): 166-181.
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H y Bonhoeffer, T** (1995). "Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(19): 8856-8860.
- Kovalchuk, Y., Hanse, E., Kafitz, KW y Konnerth, A** (2002). "Postsynaptic Induction of BDNF-Mediated Long-Term Potentiation." Science **295**(5560): 1729-1734.
- Kramar, EA., Lin, B., Lin, CY., Arai, AC., Gall, CM y Lynch, G** (2004). "A novel mechanism for the facilitation of theta-induced long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor." J Neurosci **24**(22): 5151-5161.

Lao-Peregrín, C (2012). Modulación de la plasticidad sináptica mediada por la proteína sustrato del receptor de insulina Tipo 2. PhD, Universidad de Castilla-La Mancha.

Laszlo, P (2010) "Caffeine intake by the US population." 85. FDA website. <http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofFoods/CFSA/N/CFSANFOIAElectronicReadingRoom/UCM333191.pdf>

Laurent, C., Eddarkaoui, S., Derisbourg, M., Leboucher, A., Demeyer, D., Carrier, S., Schneider, M., Hamdane, M., Müller, CE., Buée, L y Blum, D (2014). "Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology." Neurobiology of Aging **35**(9): 2079-2090.

Lee, EH., Hsu, WL., Ma, YL., Lee, PJ y Chao, CC (2003). "Enrichment enhances the expression of sgk, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation." Eur J Neurosci **18**(10): 2842-2852.

Lessmann, V y Brigadski, T (2009). "Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update." Neurosci Res **65**(1): 11-22.

Lessmann, V., Gottmann, K y Malcangio, M (2003). "Neurotrophin secretion: current facts and future prospects." Prog Neurobiol **69**(5): 341-374.

Lieberman, HR., Wurtman, RJ., Emde, GG., Roberts, C y Coviella, IL (1987). "The effects of low doses of caffeine on human performance and mood." Psychopharmacology (Berl) **92**(3): 308-312.

Lisman, JE y Jensen, O (2013). "The theta-gamma neural code." Neuron **77**(6): 1002-1016.

Loke, WH (1988). "Effects of caffeine on mood and memory." Physiol Behav **44**(3): 367-372.

Loy, R., Koziell, DA., Lindsey, JD y Moore, RY (1980). "Noradrenergic innervation of the adult rat hippocampal formation." J Comp Neurol **189**(4): 699-710.

Lu, Y., Christian, K y Lu, B (2008). "BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory?" Neurobiol Learn Mem **89**(3): 312-323.

Malenka, RC (1991). "Postsynaptic factors control the duration of synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus." Neuron **6**(1): 53-60.

Malenka, RC., Kauer, JA., Zucker, RS y Nicoll, RA (1988). "Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission." Science **242**(4875): 81-84.

Malenka, RC y Nicoll, RA (1993). "NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms." Trends Neurosci **16**(12): 521-527.

- Martin, ED y Buno, W** (2003). "Caffeine-mediated presynaptic long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons." J Neurophysiol **89**(6): 3029-3038.
- Martin, ED y Buño, W** (2005). "Stabilizing effects of extracellular ATP on synaptic efficacy and plasticity in hippocampal pyramidal neurons." Eur J Neurosci **21**(4): 936-944.
- Martín, ED y Buño, W** (2003). "Caffeine-Mediated Presynaptic Long-Term Potentiation in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons." Journal of Neurophysiology **89**(6): 3029-3038.
- Martin, SJ., Grimwood, PD y Morris, RG** (2000). "Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis." Annu Rev Neurosci **23**: 649-711.
- Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., Nemoto, T., Fukata, M y Poo, MM** (2009). "Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite." J Neurosci **29**(45): 14185-14198.
- Minichiello, L** (2009). "TrkB signalling pathways in LTP and learning." Nat Rev Neurosci **10**(12): 850-860.
- Minichiello, L., Calella, AM., Medina, DL., Bonhoeffer, T., Klein, R y Korte, M** (2002). "Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation." Neuron **36**(1): 121-137.
- Minichiello, L., Korte, M., Wolfer, D., Kuhn, R., Unsicker, K., Cestari, V., Rossi-Arnaud, C., Lipp, HP., Bonhoeffer, T y Klein, R** (1999). "Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning." Neuron **24**(2): 401-414.
- Mogul, DJ., Adams, ME y Fox, AP** (1993). "Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type Ca²⁺ current in hippocampal CA3 neurons." Neuron **10**(2): 327-334.
- Monfils, MH y Teskey, GC** (2004). "Skilled-learning-induced potentiation in rat sensorimotor cortex: a transient form of behavioural long-term potentiation." Neuroscience **125**(2): 329-336.
- Moore, KA., Nicoll, RA y Schmitz, D** (2003). "Adenosine gates synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14397-14402.
- Moy, GA y McNay, EC** (2013). "Caffeine prevents weight gain and cognitive impairment caused by a high-fat diet while elevating hippocampal BDNF." Physiol Behav **109**: 69-74.

- Nakagawara, A., Azar, CG., Scavarda, NJ y Brodeur, GM** (1994). "Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas." Mol Cell Biol **14**(1): 759-767.
- Nehlig, A., Daval, JL y Debry, G** (1992). "Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects." Brain Res Brain Res Rev **17**(2): 139-170.
- Nicoll, RA y Malenka, RC** (1999). "Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation." Ann N Y Acad Sci **868**: 515-525.
- Nikodijevic, O., Jacobson, KA y Daly, JW** (1993). "Locomotor activity in mice during chronic treatment with caffeine and withdrawal." Pharmacol Biochem Behav **44**(1): 199-216.
- Novkovic, T., Mittmann, T y Manahan-Vaughan, D** (2015). "BDNF contributes to the facilitation of hippocampal synaptic plasticity and learning enabled by environmental enrichment." Hippocampus **25**(1): 1-15.
- Panja, D y Bramham, CR** (2014). "BDNF mechanisms in late LTP formation: A synthesis and breakdown." Neuropharmacology **76 Pt C**: 664-676.
- Paxinos, G y Franklin, KBJ** (2001). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Second Edition, Academic Press.
- Pekarsky, Y., Hallas, C., Palamarchuk, A., Koval, A., Bullrich, F., Hirata, Y., Bichi, R., Letofsky, J y Croce, CM** (2001). "Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(7): 3690-3694.
- Pereira, DB., Rebola, N., Rodrigues, RJ., Cunha, RA., Carvalho, AP y Duarte, CB** (2006). "Trkb receptors modulation of glutamate release is limited to a subset of nerve terminals in the adult rat hippocampus." J Neurosci Res **83**(5): 832-844.
- Phelps, EA** (2004). "Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex." Curr Opin Neurobiol **14**(2): 198-202.
- Popoli, P., Sagratella, S y Scotti de Carolis, A** (1987). "An EEG and behavioural study on the excitatory properties of caffeine in rabbits." Arch Int Pharmacodyn Ther **290**(1): 5-15.
- Porkka-Heiskanen, T., Strecker, RE., Thakkar, M., Bjorkum, AA., Greene, RW y McCarley, RW** (1997). "Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness." Science **276**(5316): 1265-1268.
- Raymond, CR., Redman, SJ y Crouch, MF** (2002). "The phosphoinositide 3-kinase and p70 S6 kinase regulate long-term potentiation in hippocampal neurons." Neuroscience **109**(3): 531-536.

- Reissig, CJ., Strain, EC y Griffiths, RR** (2009). "Caffeinated energy drinks--a growing problem." Drug Alcohol Depend **99**(1-3): 1-10.
- Robertson, D., Frölich, JC., Carr, RK., Watson, JT., Hollifield, JW., Shand, DG y Oates, JA** (1978). "Effects of Caffeine on Plasma Renin Activity, Catecholamines and Blood Pressure." New England Journal of Medicine **298**(4): 181-186.
- Rogan, MT., Staubli, UV y LeDoux, JE** (1997). "Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala." Nature **390**(6660): 604-607.
- Saarelainen, T., Pussinen, R., Koponen, E., Alhonen, L., Wong, G., Sirvio, J y Castren, E** (2000). "Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons have impaired long-term spatial memory but normal hippocampal LTP." Synapse **38**(1): 102-104.
- Santi, S., Cappello, S., Riccio, M., Bergami, M., Aicardi, G., Schenk, U., Matteoli, M y Canossa, M** (2006). "Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and LTP maintenance." EMBO J **25**(18): 4372-4380.
- Santos, AR., Comprido, D y Duarte, CB** (2010). "Regulation of local translation at the synapse by BDNF." Prog Neurobiol **92**(4): 505-516.
- Santos, LM., Dzirasa, K., Kubo, R., Silva, MT., Ribeiro, S., Sameshima, K., Valle, AC y Timo-Iaria, C** (2008). "Baseline hippocampal theta oscillation speeds correlate with rate of operant task acquisition." Behav Brain Res **190**(1): 152-155.
- Sato, I y Kamiya, H** (2011). "Assessing the roles of presynaptic ryanodine receptors and adenosine receptors in caffeine-induced enhancement of hippocampal mossy fiber transmission." Neurosci Res **71**(2): 183-187.
- Schildt, S., Endres, T., Lessmann, V y Edelmann, E** (2013). "Acute and chronic interference with BDNF/TrkB-signaling impair LTP selectively at mossy fiber synapses in the CA3 region of mouse hippocampus." Neuropharmacology **71**: 247-254.
- Scholz, KP y Miller, RJ** (1992). "Inhibition of quantal transmitter release in the absence of calcium influx by a G protein-linked adenosine receptor at hippocampal synapses." Neuron **8**(6): 1139-1150.
- Schratt, GM., Nigh, EA., Chen, WG., Hu, L y Greenberg, ME** (2004). "BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development." J Neurosci **24**(33): 7366-7377.
- Schulz, PE., Cook, EP y Johnston, D** (1994). "Changes in paired-pulse facilitation suggest presynaptic involvement in long-term potentiation." J Neurosci **14**(9): 5325-5337.

- Selcher, JC., Atkins, CM., Trzaskos, JM., Paylor, R y Sweatt, JD** (1999). "A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning." Learn Mem **6**(5): 478-490.
- Serrano, P., Yao, Y y Sacktor, TC** (2005). "Persistent phosphorylation by protein kinase Mzeta maintains late-phase long-term potentiation." J Neurosci **25**(8): 1979-1984.
- Shapiro, ML y Eichenbaum, H** (1999). "Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons." Hippocampus **9**(4): 365-384.
- Simons, SB., Caruana, DA., Zhao, M y Dudek, SM** (2012). "Caffeine-induced synaptic potentiation in hippocampal CA2 neurons." Nat Neurosci **15**(1): 23-25.
- Staubli, U y Xu, FB** (1995). "Effects of 5-HT₃ receptor antagonism on hippocampal theta rhythm, memory, and LTP induction in the freely moving rat." J Neurosci **15**(3 Pt 2): 2445-2452.
- Svenningsson, P., Nomikos, GG y Fredholm, BB** (1995a). "Biphasic changes in locomotor behavior and in expression of mRNA for NGFI-A and NGFI-B in rat striatum following acute caffeine administration." J Neurosci **15**(11): 7612-7624.
- Svenningsson, P., Nomikos, GG., Ongini, E y Fredholm, BB** (1997). "Antagonism of adenosine A_{2A} receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens." Neuroscience **79**(3): 753-764.
- Svenningsson, P., Strom, A., Johansson, B y Fredholm, BB** (1995b). "Increased expression of c-jun, junB, AP-1, and preproenkephalin mRNA in rat striatum following a single injection of caffeine." J Neurosci **15**(5 Pt 1): 3583-3593.
- Sweatt, JD** (2004). "Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory." Curr Opin Neurobiol **14**(3): 311-317.
- Sweatt, JD** (2010). Chapter 1 - Introduction: The Basics of Psychological Learning and Memory Theory. Mechanisms of Memory (Second Edition). J. D. Sweatt. London, Academic Press: 1-23.
- Takahashi, RN., Pamplona, FA y Prediger, RD** (2008). "Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies." Front Biosci **13**: 2614-2632.
- Tanaka, Y., Sakurai, M., Goto, M y Hayashi, S** (1990). "Effect of xanthine derivatives on hippocampal long-term potentiation." Brain Res **522**(1): 63-68.
- Teles-Grilo Ruivo, LM y Mellor, JR** (2013). "Cholinergic modulation of hippocampal network function." Front Synaptic Neurosci **5**: 2.

Tort, AB., Komorowski, RW., Manns, JR., Kopell, NJ y Eichenbaum, H (2009). "Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(49): 20942-20947.

Tyler, WJ., Alonso, M., Bramham, CR y Pozzo-Miller, LD (2002). "From Acquisition to Consolidation: On the Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Hippocampal-Dependent Learning."

Whitlock, JR., Heynen, AJ., Shuler, MG y Bear, MF (2006). "Learning induces long-term potentiation in the hippocampus." Science **313**(5790): 1093-1097.

Wojtowicz, T y Mozrzymas, JW (2015). "Diverse impact of neuronal activity at theta frequency on hippocampal long-term plasticity." J Neurosci Res: n/a-n/a.

Woo, NH., Teng, HK., Siao, CJ., Chiaruttini, C., Pang, PT., Milner, TA., Hempstead, BL y Lu, B (2005). "Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression." Nat Neurosci **8**(8): 1069-1077.

Yoshimura, H., Sugai, T., Onoda, N., Segami, N y Kato, N (2002). "Age-dependent occurrence of synchronized population oscillation suggestive of a developing functional coupling between NMDA and ryanodine receptors in the neocortex." Brain Res Dev Brain Res **136**(1): 63-68.

Zhou, XF., Song, XY., Zhong, JH., Barati, S., Zhou, FH y Johnson, SM (2004). "Distribution and localization of pro-brain-derived neurotrophic factor-like immunoreactivity in the peripheral and central nervous system of the adult rat." J Neurochem **91**(3): 704-715.

Zucconi, S., Volpato, C., Adinolfi, F., Gandini, E., Gentile, E., Loi, A y Fioriti, L (2013) "Gathering consumption data on specific consumer groups of energy drinks." **2013:EN-394.**, 190.